

Universität Rostock

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie

Betreuer: Dr. med. Eberhard Grambow

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Der Einfluss von Hydrogensulfid auf die Aktivität humaner Endothelzellen und die Neointimabildung im Mausmodell



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Gina Klee

geboren am 31.08.1994 in Güstrow

Rostock 2019

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie,
Universität Rostock
2. Gutachter: PD Dr. sc. nat. Marcus Frank, Elektronenmikroskopisches Zentrum,
Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Eike Sebastian Debus, Universitäres Herz- und Gefäßzentrum,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Jahr der Einreichung: 2019

Jahr der Verteidigung: 2020

*„Ich wollte nicht nur Namen von Dingen wissen. Ich erinnere mich,
dass ich wirklich wissen wollte, wie alles funktioniert hat.“*

Elizabeth Blackburn

1	Zusammenfassung.....	4
2	Abstract.....	6
3	Glossar.....	7
4	Einleitung	10
4.1	Hydrogensulfid	10
4.1.1	Metabolismus.....	10
4.1.1.1	Cystathionin γ -Lyase.....	11
4.1.1.2	Cystathionin β -Synthase	12
4.1.1.3	3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase	12
4.1.2	Protein S-Sulfhydrierung	13
4.1.3	Endogene Funktionen	13
4.1.3.1	Zentralnervensystem.....	14
4.1.3.2	Herz-Kreislaufsystem	16
4.1.3.3	Gerinnungssystem	17
4.2	Thrombogenese	18
4.2.1	Virchow Trias	19
4.3	Endothelzellen.....	20
4.3.1	Funktionen der Endothelzellen	21
4.3.1.1	Endothelzellen im Rahmen der Hämostase.....	22
4.3.2	Endotheliale Adhäsionsmoleküle.....	24
4.3.2.1	Selektine	24
4.3.2.2	Integrine	25
4.3.2.3	Immunoglobulin-Superfamilie	25
4.3.3	Endothelaktivierung.....	27
5	Zielstellung	28
6	Material und Methodik	29
6.1	Hydrogensulfid Donor GYY4137	29
6.2	<i>In vitro</i> Experimente	30
6.2.1	HUVECs.....	30
6.2.2	WST Assay	30

6.2.3	Durchflusszytometrie.....	31
6.2.4	ELISA.....	33
6.2.5	Biotin Switch Assay.....	34
6.2.6	Migrationsassay.....	35
6.3	<i>In vivo</i> Experimente.....	36
6.3.1	Versuchstiere.....	36
6.3.2	Versuchsgruppen.....	36
6.3.3	Experimentelles Tiermodell.....	37
6.3.3.1	Anästhesie.....	37
6.3.3.2	Präparation der Arteria carotis.....	37
6.3.3.3	Schädigung der Arteria carotis mit FeCl ₃	39
6.3.3.4	Intravenöse Applikation von GYY4137/DMSO.....	39
6.3.3.5	Resektion der Arteria carotis.....	39
6.3.4	Histologie/Immunhistochemie.....	40
6.4	Statistische Analyse.....	43
7	Ergebnisse.....	44
7.1	WST Assay.....	44
7.2	Durchflusszytometrie.....	44
7.3	ELISA.....	47
7.4	Biotin Switch Assay.....	48
7.5	Migrationsassay.....	49
7.6	Neointimabildung.....	51
7.7	Immunhistochemie.....	52
8	Diskussion.....	54
8.1	Diskussion von Material und Methodik.....	54
8.1.1	Hydrosulfid Donor GYY4137.....	54
8.1.2	WST Assay.....	55
8.1.3	Durchflusszytometrie.....	55
8.1.4	ELISA.....	56
8.1.5	Biotin Switch Assay.....	56

8.1.6	Migrationsassay	57
8.1.7	<i>In vivo</i> FeCl ₃ -Thrombosemodell	57
8.1.7.1	C57BL/6J-Tyr Maus	57
8.1.7.2	Narkose.....	58
8.1.7.3	Modell der FeCl ₃ -Schädigung.....	59
8.2	Diskussion der Ergebnisse	60
9	Schlussfolgerung	70
10	Literaturverzeichnis.....	72
11	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	88
11.1	Abbildungen	88
11.2	Tabellen	89
12	Danksagung	90
13	Eidesstaatliche Erklärung	91
14	Thesen zur Dissertation	92

1 Zusammenfassung

Zielstellung: Das Endothel ist eine wesentliche zelluläre Komponente im komplexen hämostasiologischen System und besitzt Enzymsysteme zur Synthese des gasförmigen Transmitters Hydrogensulfid (H_2S). H_2S entfaltet auf vaskulärer Ebene zahlreiche protektive Funktionen. Ziel der vorgestellten Studie ist es, den Einfluss des H_2S Donors GYY4137 (GYG) auf die Aktivität humaner Endothelzellen (HUVECs) *in vitro*, sowie auf die Neointimabildung *in vivo* zu evaluieren.

Material und Methodik: Die Untersuchung der Beeinflussung der Aktivität von HUVECs durch GYG erfolgte in einem ersten Schritt durchflusszytometrisch, indem die Adhäsionsmoleküle CD62E, CD54 und CD106 auf ruhenden, mit $TNF-\alpha$ aktivierten oder mit 1, 5 oder 10 mM GYG behandelten und unmittelbar im Anschluss mit $TNF-\alpha$ stimulierten Endothelzellen analysiert wurden. Eine potentielle Reversibilität von GYG wurde anhand der CD62E Expression durch $TNF-\alpha$ Stimulation 24h nach der GYG Exposition mit 10 mM untersucht. Zum Ausschluss toxischer Effekte wurde ein WST Assay durchgeführt. Zur Analyse der Zellaktivität GYG behandelter HUVECs wurde zusätzlich ein ELISA zur Detektion des von Willebrand Faktors (vWF) durchgeführt. Die Analyse der Protein S-Sulphydrierung erfolgte unter Verwendung des Biotin Switch Assays. Weiterhin wurde ein Migrationsassay durchgeführt, bei dem die Migration von unbehandelten, VEGF stimulierten, mit 1 mM GYG behandelten bzw. gleichzeitig mit VEGF und GYG behandelten HUVECs untersucht wurde. *In vivo* diente das $FeCl_3$ -Thrombosemodell der Arteria carotis zur Evaluation des Einflusses von GYG auf die Neointimabildung. Die Mäuse wurden unmittelbar nach Induktion der Carotisläsion i.v. mit GYG oder dem Vehikel behandelt. Die an Tag 7 oder Tag 21 entnommenen Carotiden wurden sowohl morphometrisch mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung als auch immunhistochemisch durch Bestimmung der Expression von alpha-smooth muscle actin (α -SMA) und proliferating cell nuclear antigen (PCNA) analysiert.

Ergebnisse: Die Vorbehandlung mit GYG vor der $TNF-\alpha$ induzierten Aktivierung der HUVECs führt im Vergleich zur alleinigen Stimulation zu einer signifikanten, dosisabhängigen Reduktion der Expression von CD62E und des mittleren

Fluoreszenzshiftes von CD54. Demgegenüber zeigt die Expressionsanalyse von CD106 nur eine marginale Beeinflussung durch GYY. Erfolgte die TNF- α Stimulation erst 24h nach der GYY Behandlung, so zeigen mit 10 mM GYY behandelte HUVECs eine CD62E Expression wie unter alleiniger Stimulation. Im WST Assay konnten nach drei Stunden keinerlei Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen aufgezeigt werden. Des Weiteren führt GYY zur Reduktion der vWF Sekretion, steigert signifikant die S-Sulphydrierung endothelialer Proteine und schränkt die Migration der HUVECs ein. Die *in vivo* Untersuchungen zeigen eine Reduktion der Neointimabildung und Abnahme der Anzahl der α -SMA und PCNA positiven Zellen unter GYY Behandlung.

Schlussfolgerung: Anhand der Daten kann postuliert werden, dass GYY die Aktivierbarkeit von HUVECs reversibel reduziert. Zudem konnte eine toxische Wirkung ausgeschlossen werden. *In vivo* führt GYY zu einer verminderten Neointimabildung.

2 Abstract

Purpose: The endothelium is crucial during thrombogenesis. This study aims to evaluate the effect of the H₂S donor GYY4137 (GYG) on the activity of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* and on neointimal formation *in vivo*.

Materials and Methods: Flow cytometry of resting, TNF- α stimulated or with 1, 5 or 10 mM GYG treated and subsequently stimulated HUVECs was performed to analyze the expression of CD62E, CD54 and CD106. To study a potential reversibility of the GYG action, CD62E expression was further assessed on HUVECs activated 24h after exposure to 10 mM GYG. A WST assay was performed to exclude toxic effects. To examine the cellular activity of GYG treated HUVECs, an ELISA for detection of von Willebrand factor (vWF) was additionally performed. Biotin switch assay served for analysis of S-sulphydration of GYG exposed endothelial proteins. Furthermore a migration assay was carried out, in which the migration of untreated, VEGF stimulated, 1 mM GYG treated or simultaneously VEGF and GYG treated HUVECs was investigated. *In vivo* the effect of GYG on neointimal formation in the carotid artery was studied in the FeCl₃ injury model in GYG or vehicle treated mice. At day 7 or 21 after treatment, the carotid artery was removed for histological and immunohistochemical analysis.

Results: GYG treatment significantly reduces the expression of CD62E and CD54 but not of CD106. When HUVECs are stimulated 24h after GYG treatment, CD62E expression is no longer affected. The WST assay reveals no differences between the groups. GYG significantly increases the S-sulphydration of endothelial proteins, leads to a restricted migration of HUVECs and reduction of vWF secretion. The *in vivo* studies show a reduction of the neointimal formation and a decrease in number of α -smooth muscle actin and proliferating cell nuclear antigen positive cells under GYG treatment.

Conclusions: Summarizing, GYG dose dependently and reversible decreases the activation of HUVECs in an untotoxic way and reduces neointimal formation *in vivo*.

3 Glossar

3-MST	3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Kalzium
CAT	Cystein Aminotransferase
CBS	Cystathionin β -Synthase
CO	Kohlenstoffmonoxid
CSE	Cystathionin γ -Lyase
DAO	D-Aminooxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellularmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
FeCl ₃	Eisen(III)-chlorid
FSC	Vorwärtsstreuung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GYG	GYG4137
h	Stunde(n)
H ₂ S	Hydrosulfid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HuR	Human Antigen R

HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFN- γ	Interferon gamma
IL-1	Interleukin 1
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KG	Körpergewicht
Ko	Kontrolle
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LTP	Langzeitpotenzierung
MAC-1	Macrophage-1 antigen
MFS	Mittlerer Fluoreszenzshift
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMTS	Methylmethanethiosulfonat
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nekrosefaktor kappa B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
SAM	S-Adenosylmethionin

SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SMC	Smooth muscle cells
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SSC	Seitwärtsstreuung
TF	Tissue factor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
t-PA	Tissue plasminogen activator
TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
TRPV4	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4
TVT	Tiefe Venenthrombose
V.	Vena
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	Versus
vWF	Von Willebrand Faktor
Wo	Woche(n)
WPK	Weibel-Palade Körperchen
WST	Water soluble tetrazolium
ZNS	Zentralnervensystem
α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
μ l	Mikroliter
μ M	Mikrometer

4 Einleitung

4.1 Hydrogensulfid

Hydrogensulfid (H_2S), welches im allgemeinen Sprachgebrauch auch als Schwefelwasserstoff bezeichnet wird, ist ein farbloses, übelriechendes und giftiges Gas. Es besteht aus zwei Wasserstoffatomen und einem Schwefelatom. H_2S ist neben Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) der dritte endogene gasförmige Transmitter, beeinflusst ebenfalls zahlreiche Organsysteme und hat somit einen pleiotropen Charakter. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft diffundiert H_2S schnell und ohne spezifische Transportproteine durch Biomembranen.

H_2S wurde erstmals 1989 in Gehirnen von Säugetieren entdeckt (Goodwin et al. 1989, Warenycia et al. 1989) und ist seitdem Bestandteil zahlreicher Studien. Es konnten vielfältige positive rheologische Effekte nachgewiesen werden wie z.B. anti-thrombogene (Zagli et al. 2007, Grambow et al. 2014, Olas & Kontek 2014) und pro-thrombolytische Eigenschaften (Grambow et al. 2016). Außerdem konnte gezeigt werden, dass niedrige H_2S Spiegel mit einer endothelialen Dysfunktion und Entstehung von Atherosklerose in Verbindung stehen (Wang et al. 2015).

4.1.1 Metabolismus

H_2S wird physiologisch in Säugetieren gebildet. Dazu stehen dem Organismus drei Enzymsysteme zur Verfügung. Hauptsächlich sind die Enzyme Cystathionin β -Synthase (CBS) und Cystathionin γ -Lyase (CSE) an der enzymatischen Entstehung von H_2S beteiligt (Stipanuk und Beck 1982). Ein weiteres H_2S bildendes Enzym ist die in den Mitochondrien gebildete 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase (3-MST, Shibuya et al. 2009). Zunächst katalysiert die CBS die Synthese aus Homocystein zu Cystathionin (Chen et al. 2004). Aus diesem synthetisiert die CSE die Hauptquelle für die H_2S Bildung, die Aminosäure L-Cystein. Das Cystein wird wiederum von der CBS auf direktem Weg, oder durch die 3-MST über das Substrat 3-Mercaptopyruvat in H_2S umgewandelt. Des Weiteren entsteht H_2S durch die CSE aus Cystin (Abb. 1).

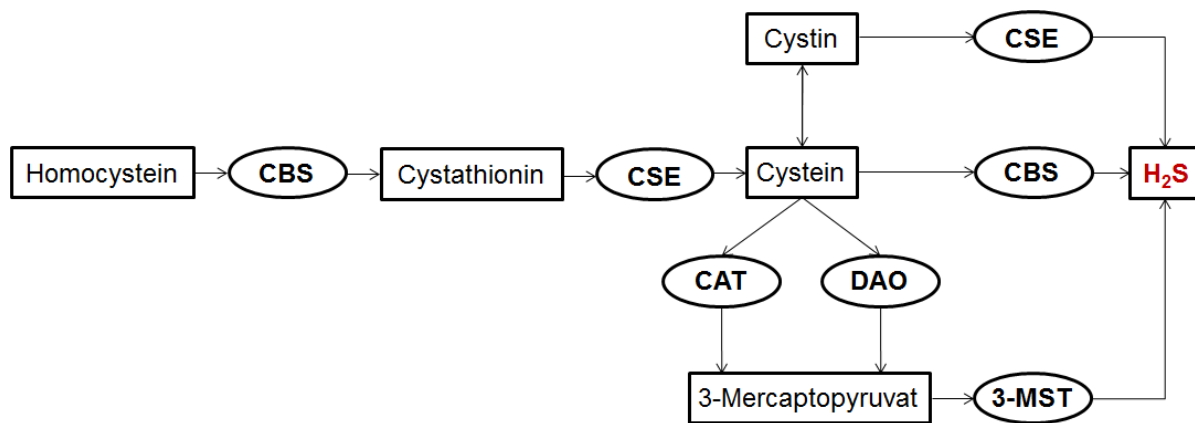


Abb. 1: Schematische Darstellung der H₂S Biosynthese.

4.1.1.1 Cystathionin γ -Lyase

Die CSE ist ein Pyridoxal-5-phosphat abhängiges Enzym und stellt das primäre Ausgangsprodukt für die H₂S Synthese bereit, in dem sie die Reaktion vom Cystathionin zum Cystein katalysiert. Außerdem bildet die CSE aus L-Cystin Thiocystein, Pyruvat und Ammoniak. Über das Thiocystein entsteht ebenfalls H₂S, indem es nichtenzymatisch in H₂S und Cystein zerfällt (Stipanuk & Beck 1982). Die Aktivität der CSE ist von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration abhängig. So findet die H₂S Produktion im steady state statt und wird supprimiert wenn die Ca²⁺-Konzentration steigt (Mikami et al. 2013). Eine Studie von Yang et al. hat im Jahr 2008 gezeigt, dass eine Inhibierung der CSE zu einer starken Abnahme der H₂S Synthese in Aorta, Herz und Serum, nicht aber im Gehirn führt. Diese Entdeckung unterstützt die These, dass die CSE in den vaskulären Endothelzellen hoch exprimiert wird (Yang et al. 2008, Bearden et al 2010). Sie ist zwar hauptsächlich im kardiovaskulären Systemen zu finden, wurde jedoch auch in Mikrogliazellen (Lee et al. 2006), im Rückenmark (Distrutti et al. 2006) und in Neuronen des Kleinhirns (García-Bereguiaín et al. 2008) nachgewiesen. Des Weiteren wird sie in der Leber und den Nieren exprimiert (Ischii et al. 2004).

4.1.1.2 Cystathionin β -Synthase

Die CBS ist, wie bereits beschrieben, an wesentlichen Schritten der Synthese des H_2S beteiligt. Sie ist ebenfalls von Pyridoxal-5-phosphat abhängig und wird durch S-Glutathionylierung (Niu et al. 2015) sowie durch S-Adenosylmethionin (SAM, Abe und Kimura 1996), welches am Carboxylende der Cystathionin β -Synthase bindet, reguliert und verstärkt aktiviert. Im Gegensatz dazu wird ihre Aktivität durch Bindung von NO oder CO an eine Hämgruppe des Aminoterminus unterdrückt (Taoka & Benerjee 2001). Da die CBS aus dem Homocystein das Cystathionin bildet, ist sie wesentlich an der Regulation des Homocysteinhaushaltes beteiligt. Mutationen im CBS Gen sind die häufigste Ursache für Homocystinurie, eine genetische Störung, die durch stark erhöhte Mengen an Gesamt-Homocystein und vermindertes Cystein im Plasma charakterisiert ist (Mudd et al. 1964, 1985). Die Homocystinurie geht außerdem mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse einher (Mudd & Levy 1978).

Primär ist die CBS im Zentralnervensystem (ZNS) zu finden und wird besonders stark im Hippocampus exprimiert (Abe & Kimura 1996, Whiteman & Moore 2009, Njie-Mbye et al. 2010). Dort ist sie hauptsächlich in den Astrozyten lokalisiert (Enokido et al. 2005). Außerdem wird sie ebenfalls, wie die CSE, in den Nieren, der Leber und in Endothelzellen synthetisiert (Ishii et al. 2004, Bearden et al 2010).

4.1.1.3 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase

Das Enzym, welches erst vor einigen Jahren als H_2S bildender Biokatalysator beschrieben wurde, ist die 3-MST. Sie wandelt ihr Substrat 3-Mercaptopyruvat neben dem H_2S zu Pyruvat, Ammoniak und elementarem Schwefel um (Shibuya et al. 2009). Das Substrat wird durch Transaminierung von L-Cystein durch die Cystein Aminotransferase (CAT, Ubuka et al. 1978) bzw. durch die D-Aminooxidase (DAO) aus D-Cystein (Shibuya et al. 2013) gebildet (Abb. 1). Die Produktion des H_2S über den Weg der 3-MST und CAT ist ebenfalls von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig und findet am effektivsten während des steady states statt (Mikami et al. 2011).

3-MST ist primär in den Mitochondrien und im Zytoplasma lokalisiert (Nagahara et al. 1998). Es wird jedoch kontrovers diskutiert, in welchen Zellen des zentralen Nervensystems die 3-MST überwiegend exprimiert wird, in Neuronen oder in Astrozyten (Shibuya et al. 2009, Zhao et al. 2013). Es wurde beschrieben, dass H_2S , gebildet von der 3-MST, leicht als gebundener Sulfan-Schwefel gelagert wird und durch einen Stimulus schnell als H_2S freigesetzt werden kann (Shibuya et al. 2009, Ishigami et al. 2009). Aktuell konnte gezeigt werden, dass die Expression der 3-MST im Kortex in Folge eines Schädel-Hirn-Traumas signifikant steigt (Zhang et al. 2017). Darüber hinaus wird die 3-MST auch in Endothelzellen exprimiert (Shibuya et al. 2009).

4.1.2 Protein S-Sulfhydrierung

Unter einer S-Sulfhydrierung, auch Protein-Persulfidbildung genannt, versteht man die Bildung von -S-SH-Addukten aus Cysteingruppen (-SH). Sie bewirkt eine oxidative posttranslationale Modifikation (Paul & Snyder 2015), die eine wichtige Rolle bei der Signalvermittlung des H_2S spielt. Vor wenigen Jahren konnte festgestellt werden, dass die Protein S-Sulfhydrierung eine physiologische Modifikation vieler Proteine darstellt, die durch H_2S induziert wird (Mustafa et al. 2009). Einige Proteine wurden bereits als Ziele der Sulfhydrierung identifiziert: beispielsweise die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), β -Tubulin und Aktin, welche schätzungsweise zu 10-25% sulfhydriert werden (Mustafa et al. 2009). Aufgrund seiner Häufigkeit und chemischen Stabilität kann die Sulfhydrierung leicht durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Weiterhin stehen Biotin Switch Assays und densitometrische Analysen zur Identifizierung der Protein-Persulfidbindung zur Verfügung.

4.1.3 Endogene Funktionen

Aufgrund des pleiotropen Charakters von H_2S wurde dessen Einsatz bereits intensiv als potentiell Therapeutikum bei Ischämie- und Reperfusionsschäden in Gehirn, Herz, Lunge und Leber untersucht. Außerdem reguliert H_2S die Aktivität der NO Synthetase (NOS), um

die Produktion des Stickstoffmonoxids zu kontrollieren. Auf der einen Seite erleichtert es die Phosphorylierung der Aktivierungsstelle der endothelialen NOS (eNOS) und erhöht so die NO Produktion (King et al. 2014). Auf der anderen Seite wird die Aktivität der neuronalen NOS (nNOS) durch H_2S in den glatten Muskelzellen des Colons unterdrückt (Sha et al. 2014).

4.1.3.1 Zentralnervensystem

H_2S erreicht im ZNS physiologisch höhere Konzentrationen als in anderen Organen und ist etwa dreifach höher konzentriert als im Serum (Hogg 2009). H_2S übernimmt hier zahlreiche Funktionen (Abb. 2). Es fungiert beispielsweise als Neuromodulator, indem es NMDA-Rezeptor vermittelte Reaktionen verstärkt, die Induktion der hippocampalen Langzeitpotenzierung erleichtert und die synaptische Transmission im Hippocampus hemmt (Abe & Kimura 1996, Kimura 2014, 2015). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass H_2S eine wichtige Rolle bei der Hochregulierung des GABA β -Rezeptors, sowohl an der prä- als auch postsynaptischen Membran, spielt (Han et al. 2005). Darüber hinaus reguliert es den intrazellulären pH Haushalt in Gliazellen (Lu et al. 2010), sowie den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt in verschiedenen Zellen des Gehirns. Weiterhin führt H_2S durch die Aktivierung transienter Rezeptorpotential-(TRP)-Kanäle zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Astrozyten und den Hippocampus (Nagai et al. 2004).

Neben den neuromodulatorischen Funktionen wirkt H_2S ebenfalls neuroprotektiv. Es wurde schon lange spekuliert, dass H_2S eine Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung spielt. Bereits 1996 zeigten Morrison et al., dass die endogene Synthese des Schwefelwasserstoffs bei Alzheimer Patienten, aufgrund stark verringerter Spiegel von SAM, dem Aktivator der CBS, eingeschränkt ist (Morrison et al. 1996). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien zeigten, dass H_2S einen protektiven Effekt auf die Entstehung und den Verlauf der Alzheimer Krankheit ausübt. Des Weiteren wurde beschrieben, dass H_2S auch in Bezug auf weitere neurologische Erkrankungen, wie Morbus Parkinson (Hu et al. 2010), Schädel-Hirn-Traumata (Zhang et al. 2013) und zerebrale Ischämien protektiv wirkt. So wurde in einer

Studie bezüglich zerebraler Ischämien nachgewiesen, dass H_2S durch anti-apoptotische Effekte in murinen Neuronen eine schützende Funktion vor neuronaler Apoptose zugeschrieben werden kann, welches sich in einem abnehmenden Infarktvolumen äußerte (Lin et al. 2012).

Neuromodulation

- **NMDA-Rezeptor**
- **Hippocampale LTP**
- **Synaptische Transmission**
- **GABA β -Rezeptor**
- **Intrazelluläres Ca^{2+}**
- **Intrazellulärer pH Wert**



Neuroprotektion

- **Alzheimer Krankheit**
- **Morbus Parkinson**
- **Schädel-Hirn-Trauma**
- **Zerebrale Ischämie**

Abb. 2: Effekte von H_2S auf das ZNS. Überblick über die vielfältigen neuromodulatorischen und neuroprotektiven Funktionen des H_2S .

Der H_2S vermittelten Neuroprotektion stehen verschiedene und bereits ausführlich untersuchte Mechanismen zur Verfügung. So schützt H_2S die Nervenzellen durch seine reduzierende und somit anti-oxidative Wirkung (Yin et al. 2009) vor oxidativem Stress, der experimentell z.B. durch Glutamat (Kimura & Kimura 2004) oder Wasserstoffperoxid (Lu et al. 2008) induziert wurde. Der anti-inflammatorische Effekt von H_2S wurde erstmals 2007 von Hu et al. beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl endogenes als auch exogenes H_2S die Lipopolysaccharid induzierte NO Freisetzung und die TNF- α Produktion in Mikrogliazellen abschwächen kann (Hu et al. 2007). Neben der anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Wirkung wird H_2S ein anti-apoptotischer Effekt zugeschrieben, der auf einer Inhibition pro-apoptotischer Signalwege beruht (Zhu et al. 2007, Yin et al. 2009, Lin et al. 2012). Außerdem verringert H_2S die Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums (ER, Krishnan et al. 2011).

4.1.3.2 Herz-Kreislaufsystem

Neben dem ZNS übernimmt H_2S auch zahlreiche Funktionen im kardiovaskulären System. Einer der ersten beschriebenen physiologischen Effekte des H_2S ist die Regulation des Tonus von Blutgefäßen, was primär auf der Aktivierung ATP abhängiger K^+ -Kanäle beruht (Hosoki et al. 1997, Wang et al. 2001, Tang et al. 2005) und konsekutiv zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen führt. Die Folge ist eine Vasodilatation und Verbesserung der Perfusion des nachgeschalteten Gewebes sowie die Senkung des systemischen Blutdrucks. Die H_2S induzierte Aktivierung der K^+ -Kanäle wird dabei durch Protein S-Sulfhydrylierung der Kir6.1 Untereinheit vermittelt (Mustafa et al 2009).

Durch den bereits beschriebenen Mechanismus der Regulation der eNOS schützt H_2S den Herzmuskel vor Ischämien und Reperfusionsschäden (Elrod et al. 2007, King et al. 2014). Die genetische Überexpression der CSE in Mäusen führt zu erhöhten H_2S Spiegeln, einer verbesserten linksventrikulären Leistung und einem gesteigerten Überleben bei ischämischer Herzinsuffizienz (Calvert et al. 2010). In einem Bluthochdruck induzierten Herzinsuffizienzmodell wurde gezeigt, dass H_2S die Progression zur nachteiligen Remodellierung des linken Ventrikels verlangsamt und myokardiale Angiogenese induziert (Polhemus et al. 2013). Es wurde außerdem nachgewiesen, dass H_2S bei chronischer Ischämie eine stark pro-angiogene Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen ausübt, indem es extrazelluläre Kinase Signalkaskaden aktiviert, die das Gefäßwachstum fördern (Szabó & Papapetropoulos 2011). Viele Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass H_2S die Endothelzellproliferation und -migration stimuliert, indem entweder das Zellwachstum gesteigert oder die Neubildung von Endothelzellen induziert werden (Cai et al. 2007, Papapetropoulos et al. 2009). Die zunehmende myokardiale Vaskularisierung und Perfusion sowie das Wachstum der Kardiomyozyten sind entscheidend, um das Fortschreiten der Herzinsuffizienz zu verhindern. H_2S scheint für diese Indikation ein aussichtsreicher, pro-angiogener und damit kardioprotektiver Mediator zu sein (Polhemus und Lefer 2014). Außerdem zeigten Mani et al., dass H_2S durch Verringerung der Intimaproliferation einen protektiven Mechanismus in der Pathogenese der Atherosklerose darstellt und in CSE-

Knockout Mäusen zu einer beschleunigten Entwicklung von Atherosklerose führt (Mani et al. 2013).

4.1.3.3 Gerinnungssystem

Die Hämostase ist ein lebenswichtiger Prozess und umfasst alle Mechanismen, die zur Blutgerinnung beitragen. Man unterscheidet dabei die primäre von der sekundären Hämostase. Bei der primären Hämostase kommt es unmittelbar nach der Gefäßverletzung zur Anlagerungsreaktion der Thrombozyten an subendotheliale Strukturen wie z.B. Kollagen. Die Adhäsion erfolgt mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors (vWF, Silbernagl et al. 2010). Umgehend nach der Anlagerung erfolgt der Aktivierungsprozess der Thrombozyten, der im Wesentlichen aus der Freisetzung verschiedener Mediatoren, Formveränderung und Aggregation der Blutplättchen besteht. Zeitlich überschneidend kommt es zur sekundären Hämostase, welche überwiegend durch die Bildung von mechanisch stabilem Fibrin gekennzeichnet ist. Der initial gebildete instabile Thrombozytenthrombus wird dabei durch ein maschenwerkartiges Fibrinnetz, in das auch Erythrozyten eingebunden sind, stabilisiert. Man unterscheidet bei der Bildung des roten Thrombus die Aktivierungsphase, die Koagulationsphase und die Retraktionsphase (Silbernagl 2010).

Unter physiologischen Bedingungen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen pro- und anti-koagulatorischen Prozessen. An der Aufrechterhaltung dieses Equilibriums sind unter anderem die drei endogenen gasförmigen Mediatoren beteiligt. So wurde gezeigt, dass H₂S neben NO und CO wesentliche Funktionen in der Modulation des Gerinnungssystems zugeschrieben werden können. Im Jahr 2007 wurde erstmals der anti-thrombogene Effekt von H₂S nachgewiesen, der auf einer Inhibition der Aggregation der Thrombozyten beruht (Zagli et al. 2007, Grambow et al. 2014, Olas & Kontek 2014). Die anti-thrombogene Eigenschaft wird auf der einen Seite über die Hochregulation der NO Synthese (Kram et al. 2013) und andererseits durch die verminderte Thrombozytenaktivierung und die konsekutiv reduzierte Thrombozytenaggregation vermittelt (Morel et al. 2012, Grambow et al. 2014). Einen Mechanismus der Regulation der Adhäsionsmolekülexpression der Thrombozyten

könnte dabei die S-Sulphydrierung thrombozytärer Proteine darstellen. Diese führt zu einer signifikanten und dosisabhängigen Reduktion der Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin und Glykoproteinrezeptor GP_{IIb/IIIa} durch H₂S (Grambow et al. 2014). Neben der Adhäsion der Thrombozyten werden auch die adhäsiven Eigenschaften von Fibrinogen und Kollagen inhibiert (Morel et al. 2014). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Thrombozyten mit H₂S zu einer verminderten Granulaexozytose und Formveränderung führt (Grambow et al. 2014). Zudem hat H₂S eine pro-thrombolytische Wirkung (Grambow et al. 2016). Darüber hinaus wird die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Prothrombinzeit (PT) und die Thrombinzeit (TT) durch eine H₂S Behandlung verlängert (Olas & Kontek 2014). Außerdem kann das Endothel durch H₂S zur Angiogenese stimuliert werden, wodurch zusätzlich zur Beschleunigung der Wundheilung beigetragen wird (Altaany et al. 2014). Weitere Effekte von H₂S auf das Endothel bezüglich der Hämostase sind nicht hinreichend beschrieben und werfen hinsichtlich anderer Faktoren und Ursachen der Thrombogenese weitere Fragen auf.

4.2 Thrombogenese

Die Thrombogenese fasst die Mechanismen der Thromboseentstehung zusammen. Unter einer Thrombose versteht man eine lokale, intravasale oder intrakardiale Blutgerinnung, die zur Bildung eines Blutgerinnsels führt. Dabei kommt es zu einem partiellen oder vollständigen Verschluss eines Blutgefäßes. Man unterteilt sie anhand der Lokalisation im Gefäßsystem in arterielle und venöse Thrombosen, sowie Thrombosen der Makrozirkulation und Mikrozirkulation.

Venöse Thrombosen sind im klinischen Alltag von großer Bedeutung, wobei die tiefen Bein- und Beckenvenenthrombosen (TVT) mit einer Inzidenz von 70 bis 110 pro 100.000 Einwohner die häufigsten Formen darstellen. Dabei kommt es als Folge, trotz verbesserter Therapieoptionen, bei etwa einem Drittel der Patienten zu einer Lungenarterienembolie (White 2003). Tiefe Venenthrombosen und die Lungenarterienembolie stellen während eines Krankenhausaufenthalts auch heutzutage noch eine der Hauptursachen für Morbidität und

Letalität von Patienten dar. Doch auch für ambulante Operationen besteht ein erhöhtes Risiko (Herold 2017).

Arterielle Thrombosen entstehen hauptsächlich auf dem Boden eines atherosklerotischen Endothelschadens oder als Folge von Herzrhythmusstörungen und führen zu einer Durchblutungsstörung und Sauerstoffmangel im versorgten Gewebe. Sie manifestieren sich als Myokardinfarkt, Hirninfarkt, Mesenterialarterienischämie, periphere arterielle Gefäßverschlüsse der Extremitäten, als akuter retinaler Arterienverschluss oder auch als Niereninfarkt (Herold 2017).

4.2.1 Virchow Trias

Die „Virchow'sche Trias“ beschreibt die Ursachen einer Thrombose und ist nach dem deutschen Pathologen Rudolf Virchow (1821-1902) benannt. Demnach spielen bei den pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung einer Thrombose drei Faktoren eine wesentliche Rolle (Abb. 3), die Veränderung der Blutviskosität bzw. Blutzusammensetzung, die Veränderung des Blutflusses und die Schädigung des Endothels (Virchow 1856).

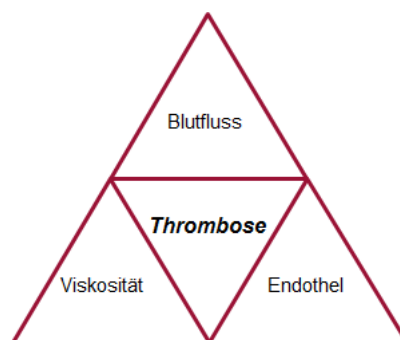


Abb. 3: Komponenten der Virchow'schen Trias: pathophysiologische Grundlagen der Entstehung einer Thrombose.

Eine Veränderung der Viskosität kann durch eine Änderung der Zusammensetzung des Blutes bedingt sein und somit zu einer Hyperkoagulabilität führen. Hierbei besteht ein Ungleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse (Herold 2017). Die Risikofaktoren der Hyperkoagulabilität können entweder angeboren oder erworben sein (Seligsohn & Lubetsky

2001). Hereditäre Thrombophilien können sich beispielsweise im jungen Alter des ersten Auftretens einer TVT oder durch rezidivierende Thrombosen äußern. Aufgrund eines Protein S-Mangels oder eines Antithrombin (AT)-Mangels liegt bei Heterozygotie ein zehnfach erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung einer TVT vor (Herold 2017). Der erworbene Protein S-, C-, und AT-Mangel tritt bei Leberzirrhose, Schwangerschaft und auch bei disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) auf. Andere erworbene Risikofaktoren für eine Hyperkoagulabilität sind Adipositas, Rauchen, Exsikkose, die Einnahme oraler Kontrazeptiva und systemische Infektionen.

Veränderungen des Blutflusses sind am häufigsten durch Immobilisation, z.B. in Folge eines operativen Eingriffes, bedingt. Es kommt aber auch durch rechtsventrikuläre und linksventrikuläre Herzinsuffizienz sowie eine lokale Stase zu einer Strömungsverlangsamung, was die Bildung einer Thrombose begünstigt. Varizen können zu einer Wirbelbildung und somit ebenfalls zu Blutstromveränderungen führen (Herold 2017). Dabei entsteht anstelle einer linearen Strömung eine turbulente Strömung.

Endothelalterationen entstehen unter anderem aufgrund lokaler Entzündungen, Traumata, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus und durch Nikotinabusus (Herold 2017).

4.3 Endothelzellen

Im Jahr 2000 beschrieb Cooke das Endothel als größtes Organ des Körpers, welches etwa der Größe von sechs Tennisplätzen entspricht (Cooke 2000). Es kleidet alle Blutgefäße von innen aus und stellt die entscheidende Barriere zwischen Intra- und Extravasalraum dar. Histologisch bildet das Endothel mit der subendothelialen Schicht und der Membrana elastica interna die Tunica intima. Das Endothel ist ein einschichtiger, lückenloser Belag aus platten, polygonalen Zellen, die mit ihrer Längsachse parallel zum Blutstrom ausgerichtet sind und auf einer Basallamina sitzen (Lüllmann-Rauch 2012).

Man unterscheidet histologisch das kontinuierliche, fenestrierte und diskontinuierliche Endothel, wobei das kontinuierliche, geschlossene Endothel in den meisten Abschnitten des Gefäßsystems vorkommt. Die Permeabilität ist entsprechend des Organs sehr

unterschiedlich. Ein Sonderfall ist das kontinuierliche Endothel der Hirnkapillaren, deren Permeabilität im Gegensatz zu anderen Kapillaren ca. einhundertfach niedriger ist. Diese Eigenschaft des Endothels trägt wesentlich zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke bei (Lüllmann-Rauch 2012). Die apikale Oberfläche der Endothelzellen ist mit einer bis zu 500 nm dicken Glykokalyx versehen, die für die selektive Permeabilität des Endothels verantwortlich ist. Das Endothel ist außerdem mit Adhärenskontakten, Tight junctions und Gap junctions ausgestattet, wodurch es den Durchtritt von Plasmabestandteilen kontrolliert und den Kontakt zwischen Blutzellen und Extrazellulärmatrix verhindert (Lüllmann-Rauch 2012).

4.3.1 Funktionen der Endothelzellen

Neben der bereits erwähnten Barrierefunktion zwischen Blut und Interstitium können dem Endothel zahlreiche weitere Funktionen zugeschrieben werden. Die wesentliche Funktion besteht darin, den systemischen Blutfluss und die Perfusion des Gewebes durch Veränderung des Gefäßdurchmessers und des Gefäßtonus zu regulieren. Die Endothelzellen sind mit den glatten Myozyten der Media durch myoendotheliale Kontakte verbunden (Lüllmann-Rauch 2012) und ermöglichen somit die Einstellung der Gefäßweite. Außerdem sezerniert das Endothel Mediatoren, die zur Regulation der Gefäßweite beitragen. Dazu gehören z.B. das vasokonstringierend wirkende Endothelin und das vasodilatatorisch wirkende, von der eNOS gebildete Stickstoffmonoxid. Des Weiteren reguliert das Endothel die Rekrutierung und Extravasation von Leukozyten als Reaktion auf Gewebeschädigung und Infektion durch Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen (Cotran & Pober 1990, Ebnet & Vestweber 1999). Endothelzellen haben eine entscheidende Rolle im Heilungsprozess nach Verletzung oder Entzündung. Sie fungieren als Vektor der Angiogenese, die für die korrekte Bildung von Granulationsgewebe und Gewebereparatur sowie für die Rekanalisation von wandständigen und okkludierenden Fibringerinnenseln essentiell ist. Der wichtigste pro-angiogenetische Faktor stellt der vascular endothelial growth factor (VEGF) dar. Schließlich exprimiert die luminal Oberfläche des Endothels viele

Moleküle, die die Aktivierung von Thrombozyten und die Koagulationskaskade regulieren, wodurch der Blutfluss erhalten und die Thrombusbildung nach der Gefäßverletzung verhindert wird (Pearson 1999, Van Hinsbergh 2012).

4.3.1.1 Endothelzellen im Rahmen der Hämostase

Endothelzellen nehmen in der vaskulären Hämostase eine Schlüsselfunktion ein. Das Endothel fungiert als aktives regulatorisches Organ, das die Hämostase aufrechterhält. Die Zellen befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht und passen sich mit ihrem Phänotyp der aktuellen Situation und Umgebung an (Cines et al. 1998, Pober & Sessa 2007). Unter physiologischen Bedingungen besitzt die luminale Oberfläche der ruhenden Endothelzellen einen anti-thrombogenen Charakter, indem es die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten hemmt und die Aktivierung des Koagulationssystems verhindert. Im Gegensatz zu ruhenden Endothelzellen erlangen aktivierte Endothelzellen einen pro-thrombogenen Phänotyp, der zur Thrombusbildung führt (Abb. 4).

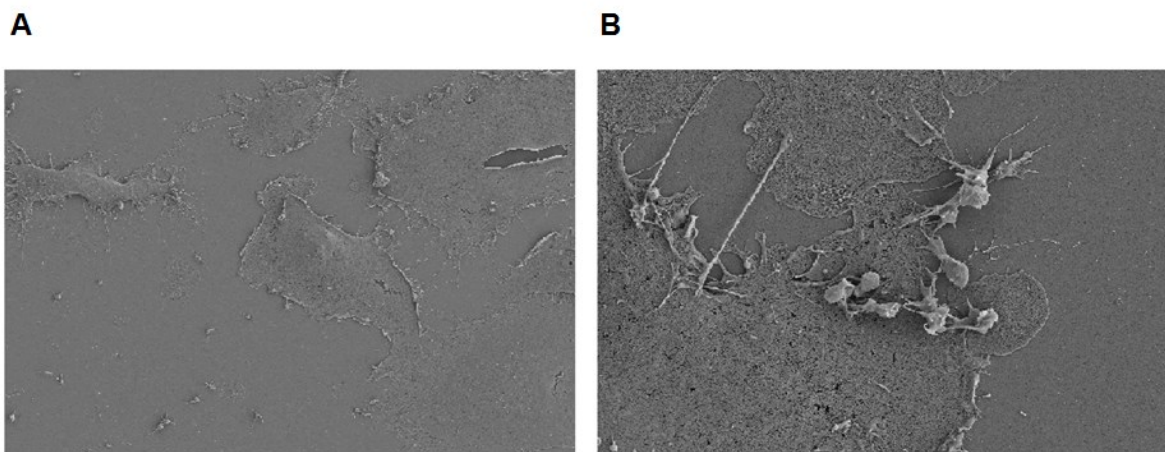


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopie aktivierter HUVECs und Thrombozyten. Übersichtsaufnahme der HUVECs und Thrombozyten in 500-facher Vergrößerung (A) und Nahaufnahme der HUVECs mit anhaftenden TRAP-aktivierten humanen Thrombozyten in 3000-facher Vergrößerung (B).

Die Zellen sind sowohl Quelle anti- als auch pro-thrombogener Mediatoren und erhalten somit das Gleichgewicht aufrecht. In Folge einer Gefäßverletzung kooperieren Endothelzellen, die subendotheliale Schicht, Plasmaproteine und Blutzellen in einem mehrstufigen Prozess, um Blutungen zu verhindern. Dieser Prozess beinhaltet die primäre Hämostase, die Aktivierung der Koagulationskaskade und schließlich die Fibrinolyse (Versteeg 2013). Die Exposition der subendothelialen Matrix und besonders die des vWF und des Kollagens induzieren das Rolling und die Adhäsion von Thrombozyten sowie die damit verbundene Thrombozytenaktivierung. Der vWF ist ein multimeres Adhäsionsglykoprotein und für die Thrombozytenadhäsion an das Kollagen essentiell. Er wird im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und vom Golgi-Komplex der Endothelzellen verarbeitet (Wagner & Marder 1984). Anschließend wird er zusammen mit P-Selektin, Angiopoetin-2, tissue plasminogen activator (t-PA) und Endothelin-1 in Weibel-Palade-Körperchen (WBK) gespeichert. Nachdem der vWF von den Endothelzellen sezerniert wurde, bildet er an dessen Oberfläche bis zu mehrere Millimeter lange Stränge. Dies führt zu ultra-langen vWF Multimeren, welche über Thrombozytenrezeptor-Glykoprotein Ib-V-IX hochfeste Bindungen mit Thrombozyten entlang des beschädigten Gefäßes bilden. Des Weiteren stabilisiert der vWF den Faktor VIII der plasmatischen Gerinnung (Dubois et al. 2007). Die Bedeutung des vWF in der Faktor VIII Stabilisierung zeigt sich bei Abwesenheit des vWF in der raschen Clearance von Faktor VIII aus der Zirkulation, was zu einem moderaten hämophilieähnlichen Phänotyp führt (Denis et al. 1998, Sadler et al. 2006). Der vWF wird anschließend schnell von seiner spezifischen Protease ADAMTS-13 gespalten, wodurch die Multimere und ihre pro-thrombogenen Eigenschaften reduziert werden (Dong 2005, Turner et al. 2009). Parallel zu diesen Ereignissen exprimieren aktivierte Endothelzellen und glatte Muskelzellen den stark pro-koagulatorischen tissue factor (TF), der den zirkulierenden Faktor VII bindet, somit aktiviert und den extrinsischen Weg der Hämostase stimuliert. Außerdem ist das Endothel durch die Produktion von t-PA an der Fibrinolyse beteiligt (Chang et al. 1997).

4.3.2 Endotheliale Adhäsionsmoleküle

Für die Kontaktaufnahme mit zirkulierenden Blutzellen nehmen endotheliale Adhäsionsmoleküle eine zentrale Funktion ein. Die unterschiedliche Zelloberflächenmolekülexpression ruhender und aktivierter Endothelzellen beeinflusst nicht nur das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-koagulatorischer Aktivität, sondern auch den Grad der Adhäsion der zirkulierenden Blutzellen. Wesentliche Rezeptorfamilien sind dabei Selektine, Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie.

4.3.2.1 Selektine

Selektine sind transmembranäre Glykoproteine und gehören zum C-Typ der Lektin Familie. Jedes der Selektine besitzt eine Ca^{2+} -abhängige extrazelluläre Lektin Domäne am N-Terminus, eine epidermal growth factor-like Domäne, eine Komplementbindungsdomäne, eine transmembrane sowie eine zytoplasmatische Domäne (McEver et al. 1995, Vestweber & Blanks 1999, McEver 2002). Man unterscheidet L-, P- und E-Selektin. L-Selektin wird konstitutiv auf der Oberfläche aller Leukozyten exprimiert und ermöglicht die Migration von neutrophilen Granulozyten (Bosse & Vestweber 1994) sowie die von P- und E-Selektin unabhängige Migration von Th1-Zellen (Hirata et al. 2002).

Endothelzellen können P- und E-Selektin exprimieren. P-Selektin wird außerdem von Megakaryozyten synthetisiert. Es wird in den α -Granula der Thrombozyten (Stenberg et al. 1985) und in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen (Van Mourik et al. 2002) gespeichert. Mediatoren wie Thrombin, Histamin oder Komplement induzieren eine rasche Umverteilung von P-Selektin zur Plasmamembran, so dass es innerhalb von Minuten nach Stimulation an der Oberfläche präsentiert wird (Bonfanti et al. 1989). Hauptligand ist neben dem Glykoprotein Ib (Romo et al. 1999) der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), der auf Leukozyten und Thrombozyten zu finden ist (Norgard et al. 1993, Varki 1994, Borges et al. 1997). Die Bindung an die Liganden ermöglicht die Interaktion zwischen Endothelzellen, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Larsen et al. 1989).

E-Selektin (CD62E) ist ausschließlich auf Endothelzellen lokalisiert und wird konstitutiv auf Endothelzellen von Haut und Knochenmark exprimiert. In den meisten anderen Gewebearten induzieren entzündliche Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und Lipopolysaccharid ihre Expression auf Endothelzellen postkapillärer Venolen (Vestweber & Blanks 1999). Ursprünglich wurde angenommen, dass E-Selektin durch Interaktion mit mehreren Glykoproteinen das Rolling der Leukozyten vermittelt. Allerdings demonstrierten Gen-Knockout-Studien, dass PSGL-1 und CD44 die Hauptliganden für dieses Adhäsionsmolekül auf Leukozyten darstellen (Xia et al. 2002, Katayama et al. 2005). Da E-Selektin als Folge eines Stimulus erst nach etwa 4 Stunden maximal exprimiert wird, spielt es in der späteren Phase der Entzündung eine entscheidende Rolle (Lawrence & Springer 1993, Abbassi et al. 1993).

4.3.2.2 Integrine

Endothelzellen sind über bestimmte Adhäsionsmoleküle, die Integrine, an die Proteine der Basalmembran gebunden. Es handelt sich bei den Integrinen um ubiquitär vorkommende Glykoproteine, wobei jedes aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Sie spielen bei der Wechselwirkung einer Vielzahl von Zellen eine wichtige Rolle. Ein Beispiel für ein wenig selektives Integrin von Endothelzellen ist das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Über diesen Rezeptor kann die Zelle auf Vitronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, Thrombin, vWF und Fibronectin adhären. Er wird trotz der Vielfalt des Liganden als Vitronectin-Rezeptor bezeichnet (Conforti et al. 1992, Luscinskas & Lawler 1994). Die Integrine sind durch die Verarbeitung von außen kommender Signale an Migration, Proliferation, Genexpression, Adhäsion und zellulärer Differenzierung beteiligt (Horwitz 1997, Shattil et al. 1998).

4.3.2.3 Immunglobulin-Superfamilie

Die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Sie weisen mehrere Immunglobulin Domänen auf und sind durch eine typische räumliche Struktur charakterisiert.

ICAM-1 (CD54) wird auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, Leukozyten, Keratinozyten und Epithelzellen exprimiert (Roebuck & Finnegan 1999). Die extrazelluläre Domäne besteht aus fünf homologen Ig-Domänen, die als Bindungspartner für die Liganden LFA-1 und MAC-1 auf Leukozyten dienen können. Wie E-Selektin ist ICAM-1 auf ruhenden Zellen nur gering exprimiert und wird durch einen pro-inflammatorischen Stimulus wie TNF- α , IL-1 und IFN- γ transkriptionell hochreguliert (Otto et al. 2006). Die Expressionssteigerung ist im Wesentlichen NF- κ B abhängig und erreicht nach etwa 18 bis 24 Stunden ihr Maximum (Ledebur & Parks 1995). Die Rolle von ICAM-1 bei Ischämie-Reperfusionsschäden wurde in verschiedenen Organen in Tiermodellen untersucht. Infolge einer 30-minütigen Myokardischämie durch Ligatur einer Koronararterie mit anschließender Reperfusion kam es zu einer signifikanten myokardialen Nekrose in Wildtyp-Mäusen, während ICAM-1 Knockout-Mäuse weniger nekrotische Läsionen aufwiesen (Metzler et al. 2001). ICAM-2 wird im Gegensatz zu ICAM-1 primär konstitutiv auf Endothelzellen präsentiert (De Fougerolles et al. 1991).

VCAM-1 (CD106) ist ein 110 kDa Glykoprotein, das konstitutiv auf Gewebemakrophagen in Milz und Thymus, dendritischen Zellen, Kupffer-Zellen der Leber und Epithelzellen (Rice et al. 1991, Bloemen et al. 1993) sowie auf der Oberfläche stimulierter Endothelzellen (Moore et al. 1992) exprimiert wird. Aufgrund seiner breiten Verteilung in menschlichen Geweben und Organen nimmt VCAM-1 an einer Vielzahl von pathophysiologischen Situationen wie Autoimmunkrankheiten, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Infektionen teil (Allavena et al. 2010, Cybulsky et al. 2001, Stanley et al. 2008). Eine Steigerung der Expression auf aktivierten Endothelzellen ist nach 2 bis 4 Stunden zu verzeichnen. Das Maximum wird allerdings erst nach etwa 16 bis 24 Stunden detektiert. Neben den Granulozyten binden auch Monozyten, Lymphozyten und verschiedene Tumorzellen an das Adhäsionsmolekül. Durch die Adhäsion der Leukozyten wird das Rolling vermittelt. Dabei dienen β_1 -Integrine auf den Leukozyten als Liganden von VCAM-1 (Elices et al. 1990).

4.3.3 Endothelaktivierung

Wie bereits beschrieben, reagiert das Endothel und adaptiert seinen Phänotyp entsprechend der verschiedenen Stimuli aus der Umgebung (Cines et al. 1998, Pober & Sessa 2007). Diese Reaktionen umfassen die akute Freisetzung von Endothelprodukten, die sofortige Reaktion auf Hypoxie durch Aktivierung hypoxieinduzierbarer Faktoren HIF-1 und HIF-2, die anschließende Induktion neuer Gene, die Induktion neuer endothelialer Rezeptoren und sezernierter Proteine durch entzündliche Zytokine, Endotoxine und Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren und CD40 Liganden, den Abbau von Oberflächenrezeptoren und die Beteiligung an immunologischen Reaktionen.

Endothelzellen können z.B. innerhalb von Minuten auf vasoaktive Stoffe, Thrombin oder TNF- α reagieren. Die Mediatoren stimulieren die Endothelzellen über Rezeptoren, die den klassischen NF- κ B Signalweg aktivieren (Hoffmann et al. 2002). Diese Akutantwort folgt der Rezeptor vermittelten Zellsignalisierung, welche von einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und einer Induktion verschiedener Arten von Phosphorylierungen begleitet wird. Diese bewirken einerseits die Aktivierung von Enzymen, die NO, Prostazyklin, Prostaglandin E2 oder auch Endothelin-1 erzeugen und andererseits die Rekrutierung von Vesikeln mit vorgeformten Proteinen an die Plasmamembran. WPK sind spezifische Vertreter dieser Speicherorganellen und setzen vWF, P-Selektin und Angiopoetin-2 frei, die an der Thrombozytenbindung, der Leukozytenrekrutierung und der Entzündungsmodulation beteiligt sind. Der aktivierte endotheliale Phänotyp ist somit pro-thrombotisch und entzündungshemmend. An einer Entzündungs- oder Verletzungsquelle ist dieser Zustand entscheidend für die vaskuläre Remodellierung und Reparatur, das Rolling der Leukozyten und die Sequestrierung von Pathogenen und Toxinen.

5 Zielstellung

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Einfluss des H₂S Donors GYY4137 auf die Aktivität humaner Endothelzellen *in vitro*, sowie auf die Neointimabildung *in vivo* zu evaluieren. In zahlreichen Studien wurde bereits gezeigt, dass H₂S einen Einfluss auf die Thrombogenese und wesentliche Faktoren der Virchow'schen Trias geltend macht. Bisher ist jedoch noch nicht hinreichend untersucht, welchen Effekt H₂S auf die Endothelzellen als einen der Faktoren der Trias ausübt. Daher ergaben sich für die vorliegende Studie folgende Fragestellungen:

1. Welchen Einfluss hat H₂S auf die Expression pro-thrombogener endothelialer Adhäsionsmoleküle aktivierter Endothelzellen?
2. Welchen Einfluss hat H₂S auf die vWF Sekretion aktivierter Endothelzellen?
3. Beeinflusst H₂S die Protein S-Sulfhydrierung endothelialer Proteine?
4. Hat H₂S einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Endothelzellen?
5. Beeinflusst H₂S die Neointimabildung im geschädigten arteriellen Gefäßareal?

6 Material und Methodik

6.1 Hydrogensulfid Donor GYY4137

Für alle folgenden Versuche diente die Substanz GYY4137 (GY, Abb. 5) als H_2S Donor (Li et al. 2008). Es ist wasserlöslich und setzt H_2S sowohl *in vitro* als auch *in vivo* langsam und in physiologischen Konzentrationen frei. Ursprünglich wurde GY als Beschleuniger bei der Vulkanisation von Naturkautschuk in den späten 1950er Jahren entwickelt und erst einige Jahrzehnte später als potentieller Arzneimittelkandidat ins Auge gefasst (Rose et al. 2015).

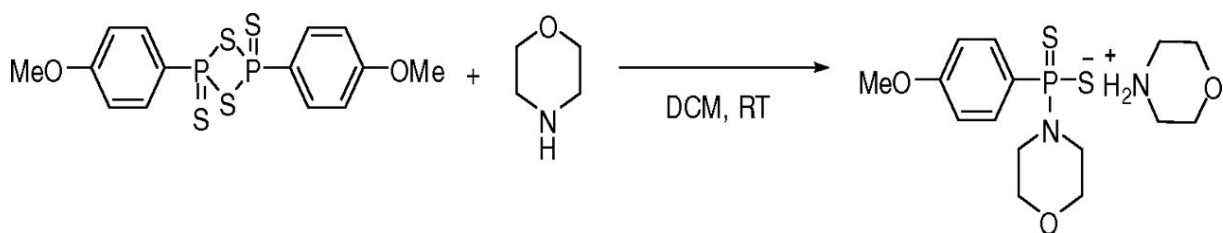


Abb. 5: Chemische Synthese von GYY4137 mit Hilfe von Dichlormethan unter Raumtemperatur (Li et al., 2008).

Gelöst wurde GY in allen Versuchen in einer Lösung bestehend aus 30% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 70% NaCl (0,9%). DMSO ist ein farb- und geruchloses organisches Lösungsmittel und entstand zunächst als Nebenprodukt der Papierfabrik bei der Umwandlung von Holz zu Zellstoff. Nachdem festgestellt wurde, dass DMSO Anti-Frost-Eigenschaften besitzt, die für Erfrierungsverletzungen genutzt werden konnten (Jacob et al. 1964), wuchs das Interesse an der Substanz in der Forschung. Tiermodelle zeigten weiterhin die Nützlichkeit des DMSO als Lokalanästhetikum sowie als bakteriostatisches und entzündungshemmendes Pharmakon (Jacob et al. 1964). Die ersten Anwendungen in der Medizin erfolgten im Rahmen von Behandlungen ischämischer Ulzera und Hautmanifestationen der Sklerodermie (Scherbel et al. 1965). Später wurde DMSO aufgrund des ausgezeichneten Eindringens in die Haut und in andere Membranen als Vehikel zum Transport pharmazeutischer Wirkstoffe in biologische Systeme genutzt (Jacob & Herschler 1986).

6.2 *In vitro* Experimente

6.2.1 HUVECs

Die *in vitro* Analysen erfolgten ausschließlich an Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). Die primär isolierten HUVECs sind die wahrscheinlich populärsten Endothelzellen in der Forschung, da die menschlichen Nabelvenen häufiger verfügbar sind als andere Arten von Blutgefäßen. Für die Versuche wurden die HUVECs (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit dem Endothelial Cell Growth Medium (C-22010, PromoCell) inklusive 2% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Zu dem Medium wurde außerdem ein Supplement-Mix, Penicillin-Streptomycin zur Antibiotikaprophylaxe und 8% FCS, um eine Gesamtkonzentration von 10% FCS zu erreichen, hinzugefügt.

6.2.2 WST Assay

Mit Hilfe des WST-1 (water soluble tetrazolium) Assays wurde zunächst eine mögliche Zytotoxizität des H₂S Donors GYY und anderer Substanzen, die in dieser Studie Anwendung finden, untersucht. Der WST Assay beruht auf der enzymatischen Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das dunkelrot gefärbte Formazan durch vitale Zellen. Die HUVECs wurden in 96 Well-Platten mit einer Zellzahl von 4×10^3 ausgeplattet. Neben den unbehandelten Zellen wurden die HUVECs separat mit dem Vehikel, mit 10 ng/ml TNF- α , welches für 3 Stunden zur inflammatorischen Stimulation der HUVECs diente, sowie für jeweils eine Stunde mit GYY in Konzentrationen von 1, 5 und 10 mM behandelt. Anschließend erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (30 Minuten, 1, 2, 3 und 4 Stunden) die Messung der Absorption mittels eines Photometers (VICTOR™ X3, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm zur Beurteilung der Absorptionsschwächungen und der damit einhergehenden potentiellen toxischen Effekte.

6.2.3 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die HUVECs in 6-Well Platten mit einer Zellzahl von 1×10^5 ausgeplattet. Nach 24 Stunden war ein konfluentes Wachstum erreicht, sodass die Behandlungen erfolgen konnten.

Im ersten Ansatz der Durchflusszytometrie (Abb. 6) erfolgte die Behandlung der HUVECs mit GYY in Konzentrationen von 1, 5 oder 10 mM für jeweils eine Stunde. Zur Analyse der E-Selektin und ICAM-1 Expression erfolgte nach Wechsel des Mediums die Aktivierung der Zellen mit TNF- α für 3 Stunden. Um die Expression von VCAM-1 zu beurteilen, wurden die HUVECs für 24 Stunden mit TNF- α inkubiert. Am Ende des Settings wurde die FACS-Analyse durchgeführt.

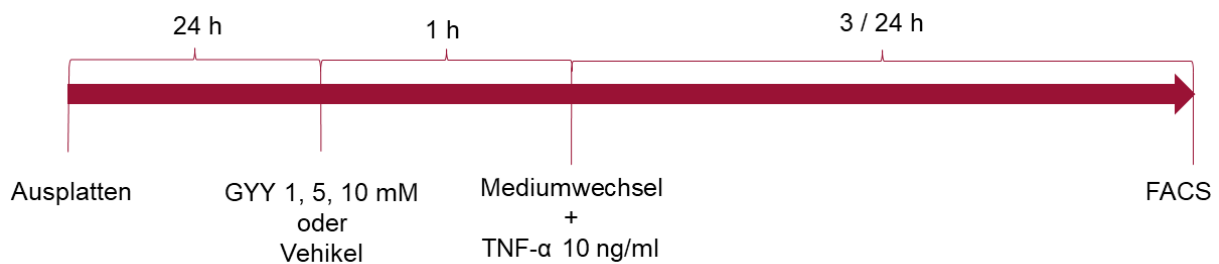


Abb. 6: Versuchsaufbau Durchflusszytometrie I. Im ersten Setting erfolgte die Behandlung der HUVECs mit 1, 5 oder 10 mM GYY für jeweils eine Stunde. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel und die Zellaktivierung durch zusätzliche Exposition mit TNF- α , entsprechend des Adhäsionsmoleküls für jeweils 3 oder 24 Stunden, sowie die anschließende FACS-Analyse.

Für eine genaue Messung wurde das FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) mit Fluoreszenz-Standard-Microbeads (CaliBRITE Beads, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) kalibriert. Von jeder Probe wurden 20.000 Zellen pro Messung ausgewertet. Die Endothelzellen wurden mit dem Programm CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) identifiziert und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert. Die Fluoreszenzmessung der unbehandelten Probe diente zur Erfassung des Dot-Plots sowie der Eigenfluoreszenz.

Für die durchflusszytometrische Analyse der E-Selektin Expression (Abb. 7) wurde ein monoklonaler, APC-markierter Maus anti-Human anti-CD62E Antikörper (20 μ l, 551144, BD

Pharmingen™, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet. Die Bestimmung der ICAM-1 Expression erfolgte durch Applikation eines monoklonalen, APC-markierten Maus anti-Human anti-CD54 Antikörper (20 µl, 559771, BD Pharmingen™, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Die Expression von VCAM-1 wurde durch Applikation eines monoklonalen, FITC-markierten Maus anti-human anti-CD106 Antikörper (20 µl, 551146, BD Pharmingen™, Franklin Lakes, New Jersey, USA) bestimmt.

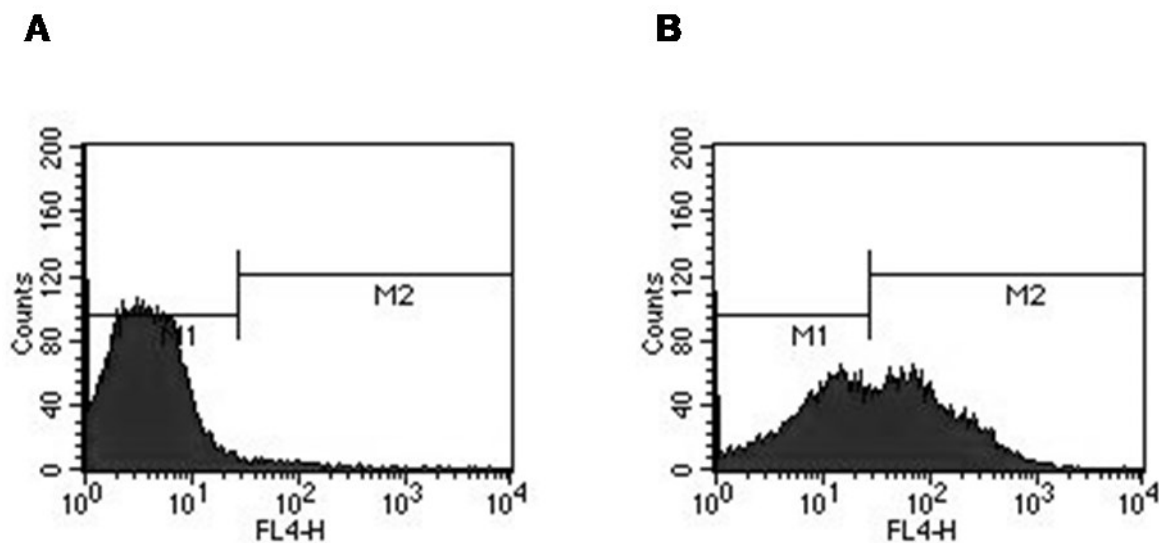


Abb. 7: Durchflusszytometrie E-Selektin. Fluoreszenzmessung der E-Selektin Expression von ruhenden, nicht stimulierten humanen Endothelzellen (A) und mit TNF- α stimulierten HUVECs (B).

Im zweiten Versuchsaufbau der Durchflusszytometrie (Abb. 8) wurde eine mögliche Reversibilität des H₂S Donors GYY anhand der E-Selektin Expression untersucht. Dazu wurden die HUVECs für eine Stunde mit der höchsten GYY Konzentration von 10 mM behandelt. Die Aktivierung der Zellen mit TNF- α erfolgte in diesem Setting jedoch erst nach weiteren 24 Stunden. Die FACS-Analyse schloss sich wiederum nach weiteren 3 Stunden an.

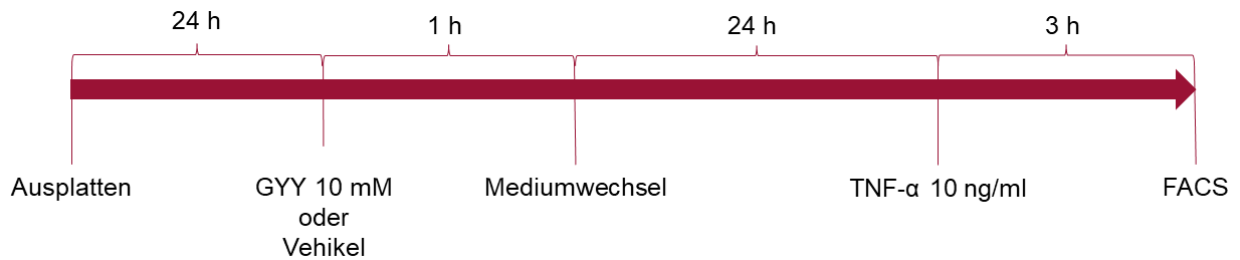


Abb. 8: Versuchsaufbau Durchflusszytometrie II. In einem zweiten Setting wurden die HUVECs mit der höchsten GYY Konzentration von 10 mM für eine Stunde behandelt. Anschließend erfolgte identisch zu Setting I ein Mediumwechsel. Um anhand der E-Selektin Expression zu untersuchen, ob die Effekte von Hydrogensulfid reversibel sind, erfolgte die dreistündige Stimulation der Endothelzellen mit TNF-α erst nach weiteren 24 Stunden.

6.2.4 ELISA

Um den Einfluss des H₂S Donors GYY auf die vWF Sekretion zu bestimmen, wurde ein ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) durchgeführt. Dazu wurden die HUVECs mit einer Zellzahl von 2×10^5 in der 96-Well Platte des Human ELISA Kit (ab189571, abcam, Cambridge, UK), welche bereits mit einem vWF spezifischen Antikörper beschichtet war, ausgeplattet. Neben der Kontrolle wurden die HUVECs zur Freisetzung des vWFs für 60 Minuten mit 100 µM Histamin stimuliert. Des Weiteren erfolgte die Behandlung der HUVECs für 30 Minuten mit GYY in Konzentrationen von 5 und 10 mM. Separat erfolgte zusätzlich zu den 30-minütigen GYY Behandlungen eine Histamin Aktivierung für jeweils eine Stunde und die Behandlung der Endothelzellen mit dem Vehikel. Anschließend wurde ein sekundärer biotinylierter humaner vWF Antikörper (ab189571, abcam, Cambridge, UK) aufgetragen. Nach einer Waschung wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat verwendet, um die Konjugation des biotinylierten Antikörpers nachzuweisen. Zum Abschluss wurde dem Versuchsansatz ein chromogenes Substrat hinzugefügt, die enzymkatalysierte Reaktion gestoppt und die Messung der Absorption mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450 nm (VICTOR™ X3, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt.

6.2.5 Biotin Switch Assay

Um den potentiellen Wirkmechanismus von H₂S zu analysieren, erfolgte die Messung der S-Sulfhydrylierung endothelialer Proteine mit Hilfe eines Biotin Switch Assays (Mustafa et al. 2009). Dazu wurden die HUVECs jeweils mit einer Konzentration von 1, 5, oder 10 mM GYY bzw. dem Vehikel exponiert. Nach der Inkubation mit Formaldehyd erfolgte die Waschung mit PBS bei 10.000 rpm für 5 Minuten. Daraufhin wurde das entstandene Pellet in HEN Puffer (250 mM Hepes-NaOH; pH 7,7; 1 mM EDTA; 0,1 mM Neocuproin), welches mit 100 µM Deferoxamin supplementiert war, resuspendiert und bei 13.000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zelllysats wurde zur Blockade unspezifischer Bindungen gepuffert (HEN Puffer eingestellt mit 2,5% Natrium-dodecyl-sulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS), mit 20 mM Methylmethanethiosulfonat (MMTS)), in neue Reagenzgefäße überführt sowie für 20 Minuten bei 50 °C kontinuierlich gevortext. Anschließend wurde das MMTS durch Zugabe von zwei Volumina Aceton entfernt und die Proteine für 20 Minuten bei -20 °C präzipitiert. Die Proteine wurden nach der Entfernung des Acetons in HEN Puffer (HEN eingestellt mit 1% SDS) resuspendiert, gefolgt von der Zugabe von vier Volumina 4 mM in DMSO gelöstem N-(6-(biotinamido)hexyl)-3-(2-pyridyldithio) propionamid (Biotin-HPDP). Nach der zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die durch Biotin-HPDP biotinylierten Proteine im Folgenden durch zwei Volumina Aceton gefällt. Vor dem Immunoblotten wurde das Aceton erneut entfernt und die Proteine in HEN Puffer resuspendiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit dem gleichen Volumen von zweifachem SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) Ladepuffer verdünnt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Das Gesamtprotein (15 µg) wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt (12% Gele) und auf Polyvinylidendifluorid Membranen aufgetragen. Die immobilisierten Proteine wurden mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) geblockt und die Membranen über Nacht bei 4 °C mit einem monoklonalen anti-Biotin Antikörper (1:1.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit einem sekundären Peroxidase gebundenen anti-Maus Antikörper (1:60.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Die Proteinexpression wurde durch Luminol verstärkte

Chemilumineszenz (ECL plus; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht und mit Hilfe des ChemiDox™ XRS Systems (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA USA) digitalisiert. Die Signale wurden am Ende des Versuches quantitativ densitometrisch ausgewertet (Quantity One, Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA USA) und gegenüber dem β -Aktin Signal (Maus monoklonaler anti- β -Aktin Antikörper; 1:20.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) normalisiert.

6.2.6 Migrationsassay

Um zu untersuchen, ob sich die Beeinflussung der endothelialen Aktivität auch im Migrationsverhalten der Zellen widerspiegelt, erfolgte ein Migrationsassay. Die Endothelzellen wurden hierfür mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ in ibidi® μ -Dish^{35mm, low} Culture Insert-Wells (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) ausgeplattet (Abb. 9).

Zunächst wurde die Migration von unbehandelten HUVECs untersucht. Des Weiteren erfolgte eine Behandlung der Zellen mit dem Vehikel. Zur Stimulation wurde dem Medium in einem weiteren Versuch VEGF zugesetzt. Zusätzlich erfolgte in separaten Ansätzen die Behandlung mit GYY in einer Konzentration von 1 mM bzw. mit 1 mM GYY und VEGF gleichzeitig. Die Migrationsanalysen erfolgten anschließend mittels Stereomikroskopie (Leica DMI4000B, Wetzlar, Deutschland) nach 0, 8, 12 und 24 Stunden. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software CAP Image (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

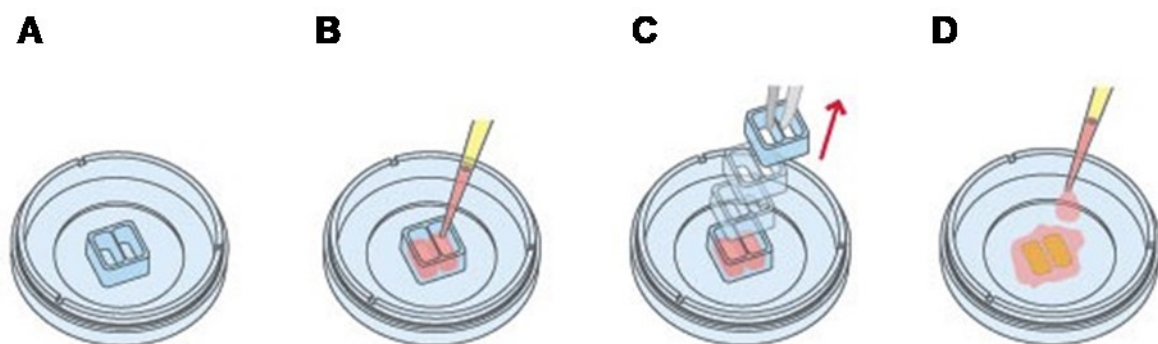


Abb. 9: Migrationsassay. Die HUVECs wurden in Culture Insert 2-Well Platten (A) (ibidi®) ausgeplattet (B). Nach etwa 24 Stunden war ein konfluentes Wachstum erreicht, so dass das Silikonkissen entfernt werden konnte (C). Anschließend erfolgten die Behandlungen der Zellen (D) und die Migrationsanalysen mittels Stereomikroskopie nach 0, 8, 12 und 24 Stunden.

6.3 *In vivo* Experimente

6.3.1 Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche wurden ausschließlich männliche C57BL/6J-Tyr Mäuse mit einem Alter zwischen zwei und sechs Monaten und einem Körpergewicht (KG) von 20 g bis 30 g verwendet. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz §8 genehmigt (AZ: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-029/17) und standen stets unter der Aufsicht des Tierschutzbeauftragten am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock.

6.3.2 Versuchsgruppen

Die Wirkung von GYY auf die Gefäßwand und die Bildung der Neointima wurde anhand vier experimenteller Gruppen untersucht (Tab. 1). Die Versuchstiere wurden unmittelbar nach der Gefäßschädigung der linken A. carotis communis einmalig durch eine Injektion von GYY (50 mg/kg KG) oder einer äquivalenten Menge des Vehikels in die rechte Vena jugularis externa behandelt. Anschließend erfolgte nach einer bzw. drei Wochen die Resektion des entsprechenden Carotissegments zur histologischen und immunhistochemischen Analyse.

Versuchsgruppen	1 Woche	3 Wochen
GYG (50 mg/kg KG in DMSO)	n=7	n=8
DMSO (30 vol/vol in 0,9% NaCl)	n=7	n=8

Tab. 1: Überblick über die *in vivo* Versuchsgruppen. Dargestellt sind die vier Versuchsgruppen mit den jeweiligen Behandlungen und der Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe.

6.3.3 Experimentelles Tiermodell

6.3.3.1 Anästhesie

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Xylazin (25 mg/kg) und Ketamin (90 mg/kg) anästhesiert. Für die initiale Anästhesie wurde eine Stammlösung aus Xylazin 2% (20 mg/ml, Rompun, Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin 10% (100 mg/ml, Belapharm, Vechta, Deutschland) in einer 1 ml Spritze (0,2 ml Xylazin, 0,6 ml Ketamin) hergestellt und verwendet. Für eine eventuell notwendige Aufrechterhaltung der Narkose wurde der gleiche Ansatz 1:10 verdünnt und erneut intraperitoneal injiziert. Zur Prophylaxe möglicher Wundschmerzen wurde eine Analgesie mit Metamizol (5 Tropfen von 500 mg/ml Metamizol in 100 ml Trinkwasser, täglicher Wechsel des Trinkwassers) durchgeführt und bereits 24 Stunden vor dem ersten Versuch begonnen, um einen konstanten Wirkspiegel unmittelbar nach dem Erwachen aus der Narkose zu gewährleisten. Die Analgesie mit Metamizol wurde über den gesamten Versuchsablauf hinweg fortgeführt.

6.3.3.2 Präparation der Arteria carotis

Für die *in vivo* Versuche wurde das Modell des Eisen(III)-chlorid (FeCl_3) induzierten Gefäßschaden an der Arteria carotis (Kurz et al. 1990, Tseng et al. 2006) gewählt. Zur Vorbereitung der Präparation wurden die Versuchstiere gewogen und gewichtsadaptiert intraperitoneal, wie in 6.3.3.1 beschrieben, mit Ketamin-Xylazin anästhesiert. Nach einer Wartezeit von etwa zehn Minuten erfolgten die Rasur des Halsfells mit einem Elektrorasierer (Exacta, Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland) und die Auftragung einer Enthaarungscreme (Pilca, Sodalco, Lodi Vecchio, Italien), um restliche Haare zu entfernen. Diese wurde nach einer Einwirkzeit von drei Minuten unter fließendem 37 °C warmem Wasser abgespült. Im Anschluss wurden die Tiere vorsichtig abgetrocknet und zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf eine 37 °C vorgewärmte Heizplatte gelegt. Zum Schutz der Augen und Prophylaxe einer möglichen Austrocknung wurde eine Salbe (Bepanthen®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) auf die Kornea aufgetragen. Nachdem die Versuchstiere auf dem Rücken gelagert und der Hals leicht überstreckt wurde, konnte mit der Präparation der linken

Arteria carotis communis begonnen werden, welche unter dem Mikroskop (Leica Microsystems, M651, Wetzlar, Deutschland) erfolgte. Nach einem Mittellinieneinschnitt des Halses, der sich vom Unterkiefer zur suprasternalen Kerbe und der darüber liegenden Haut erstreckte, wurde das freiliegende vordere Halsdreieck stumpf mit einer gebogenen Pinzette präpariert, um die linke Halsschlagader vom umgebenden Gewebe zu befreien. Anschließend wurde das Gefäß mit Hilfe der Pinzette unterfahren und für eine bessere Sicht und Hervorhebung der A. carotis communis zwei Fäden Prolene® 4-0 (Ethicon, Somerville, New Jersey, USA) unter das Gefäß gebracht (Abb. 10). Des Weiteren wurde die Freilegung und Darstellung der rechten V. jugularis externa für die intravenöse Applikation der Substanzen GYY bzw. DMSO vorbereitet.

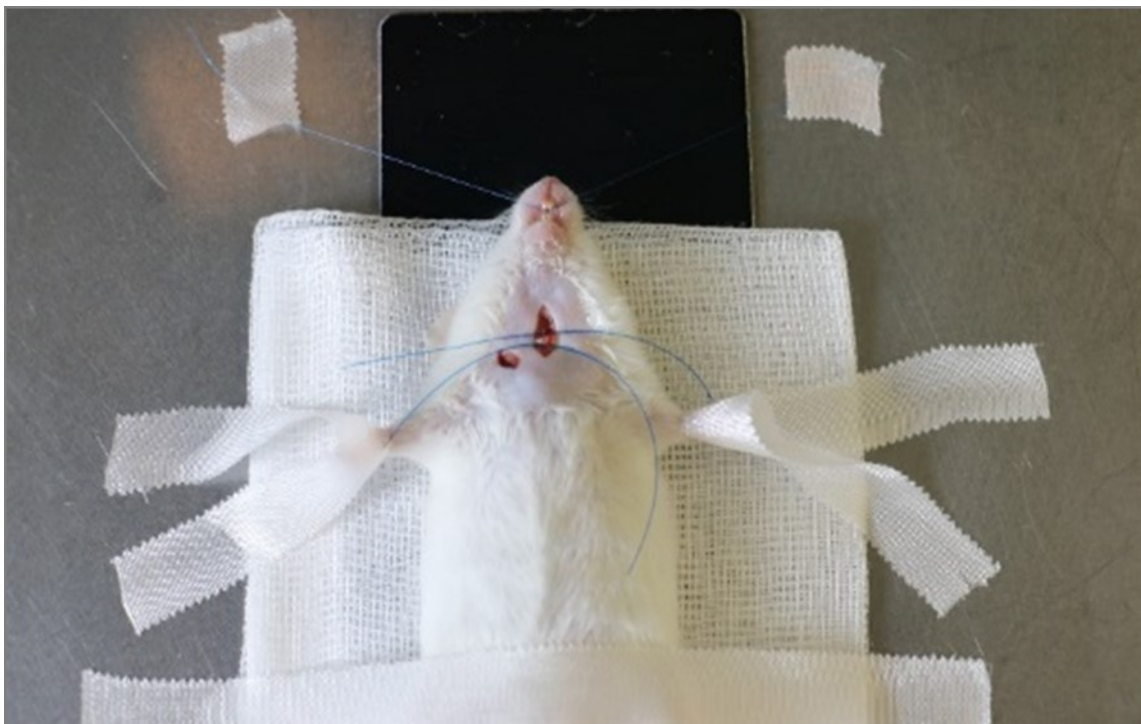


Abb. 10: Präparation der Arteria carotis. Zum Hervorheben und zur besseren Darstellung wurden zwei Fäden (Prolene® 4-0) und ein Stück Filterpapier unter die Arterie gelegt.

6.3.3.3 Schädigung der Arteria carotis mit FeCl₃

Im Anschluss an die Präparation der linken A. carotis communis erfolgte die Schädigung der Halsschlagader und Induktion eines arteriellen Thrombus mit Hilfe von FeCl₃ (Kurz et al. 1990, Tseng et al. 2006). Die Gefäßverletzung wurde induziert, indem ein Filterpapierstreifen, gesättigt mit 10% FeCl₃, für drei Minuten auf die präparierte A. carotis communis aufgelegt wurde. Die adventitielle Applikation von FeCl₃ verursacht Endothelverletzungen, Thrombozytenaggregation und einen schnellen Beginn der Thrombusbildung (Kurz et al. 1990, Tseng et al. 2006).

6.3.3.4 Intravenöse Applikation von GYY4137/DMSO

Unmittelbar nach der Schädigung der A. carotis communis wurde den Versuchstieren je nach Versuchsgruppe intravenös die Substanz GYY (50 mg/kg KG) bzw. das Vehikel in die zuvor präparierte V. jugularis externa appliziert. Im Anschluss wurden die Wunden mit einer Hautnaht (6-0 Prolene®, Ethicon, Somerville, New Jersey, USA) verschlossen. Der gesamte Versuch, inklusive der Anästhesie, Präparation und Schädigung der A. carotis communis und der i.v. Applikation von GYY bzw. des Vehikels, nahm eine Zeit von etwa 45 Minuten ein. Anschließend erwachten die Versuchstiere unter einer Rotlichtwärmelampe (Body Fit, Beurer, Ulm, Deutschland) aus der Narkose, um die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur zu gewährleisten. Bis zur Resektion des Gefäßes wurden die Tiere bei Standardfutter für Nager und freiem Zugang zu Wasser in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

6.3.3.5 Resektion der Arteria carotis

Je nach Versuchsgruppe wurde das geschädigte Carotissegment nach einer oder drei Wochen reseziert. Dazu wurden die Versuchstiere nach der entsprechenden Zeit erneut mit Ketamin-Xylazin narkotisiert und die linke A. carotis communis, wie unter 6.3.3.2 beschrieben, präpariert. Für eine bessere Sicht auf das Zwerchfell und das Herz wurde die Leber nach einer Medianlaparotomie vorsichtig mit Hilfe eines Wattestäbchens zur rechten

Seite ausgelagert. Anschließend erfolgte nacheinander die intrakardiale Applikation von 5 ml NaCl und 5 ml Formalin. Unmittelbar danach wurde die mit FeCl_3 geschädigte A. carotis oberhalb und unterhalb der makroskopisch sichtbaren Läsion mit einer mikrochirurgischen Schere abgesetzt, in einer Einbettkassette verschlossen und anschließend in einer wässrigen Formalinlösung mit 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, um das Gewebe möglichst natürlich und in der ursprünglichen Architektur zu erhalten. Die Resektion, inklusive der Anästhesie, dauerte ca. 30 Minuten.

6.3.4 Histologie/Immunhistochemie

Im Anschluss an die Resektion des Carotissegments und der Fixierung und Pufferung in Formalin (4% Formafix) wurde das Präparat in einer Histokinette (Leica TP1020, Wetzlar, Deutschland) platziert und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe schonend entwässert. Der Alkohol wurde anschließend durch das Intermedium X-TRA-Solv (Medite, 41-5583-10, Burgdorf, Deutschland) aus dem Gewebe verdrängt. Die A. carotis wurde dann in einem Gießschälchen vertikal aufgerichtet, mit heißem Paraffin (56 °C - 58 °C, Merck, Darmstadt, Deutschland) übergossen und mit Hilfe einer Paraffinausgießstation (Leica EG1160, Wetzlar, Deutschland) zu einem Paraffinblock verarbeitet. Nach Erkalten des Paraffins konnten die Blöcke geschnitten werden. Zum Anfertigen der Schnitte wurde ein Rotationsmikrotom (Leica RM2145, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Hierzu wurden die Paraffinblöcke zunächst auf Gefrierblöcken gekühlt und im Anschluss aus der Gießform herausgelöst. Die Blöcke wurden in der Haltevorrichtung des Mikrotoms eingespannt und in einem Abstand von 200 µm mit einer Schnittdicke von 4 µm geschnitten. Der Gewebeschnitt schob sich dabei auf das Messer, wurde mit einem angefeuchteten Pinsel abgehoben und in ein Warmwasserbad (37 °C, pfm medical, Köln, Deutschland) übertragen, wodurch der Schnitt gestreckt und von Falten befreit wurde. Dann wurden die Schnitte auf einen sauberen und fettfreien Objektträger (Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgezogen. Die bestückten Objektträger wurden je nach Färbung in Küvetten sortiert und bis zur entsprechenden Färbung bzw. immunhistochemischen Behandlung in einem

Brutschrank (Memmert, Büchenbach, Deutschland) getrocknet und zur besseren Haftung aufbewahrt. Nach dem Schneiden und Trocknen wurden die Schnitte mit dem Intermedium X-TRA entparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt und schließlich in den jeweiligen Färbelösungen gefärbt.

Zur Übersichtsdarstellung und Bestimmung der Dicke und Fläche der Neointimabildung wurden die histologischen Schnitte der A. carotis communis zunächst mit Hämatoxylin-Eosin (HE, Abb. 11) gefärbt. Die HE-Färbung stellt die Routinefärbung der Wahl dar, wobei Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rosa erscheinen. Dazu wurden die Präparate unter Raumtemperatur für 5 Minuten mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt und bis zum Sichtbarwerden einer Blautönung unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit 0,5% Eosin G (Merck, Darmstadt, Deutschland) für eine Minute, das Abwaschen mit Leitungswasser und die Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zum Abschluss wurden die gefärbten Präparate mit X-TRA behandelt und mit dem X-TRA Kitt (Mediate, 41-5213-00, Burgdorf, Deutschland) eingedeckt.

Des Weiteren erfolgte die immunhistochemische Untersuchung der Carotissegmente. Dabei wurde die Spezifität von Antikörpern genutzt, wodurch der Nachweis von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt gelang. Für die Anfertigung der Immunhistochemie (Abb. 11) wurden die Schnitte zunächst zur Demaskierung der Antigene einer Mikrowellenbehandlung (Bosch HMT702C, Stuttgart, Deutschland) unterzogen, wobei sie für 7 Minuten bei 700 Watt in einer Pufferlösung (Target Retrieval Solution, S1699, Dako, Carpinteria, CA, USA) mit einem pH Wert von 6,0 erhitzt wurden. Am Ende der Prozedur verblieben die Objektträger in der Pufferlösung und wurden bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach der dreifachen Spülung der Präparate wurde für 5 Minuten ein Peroxidaseblocker (S2023, Dako, Carpinteria, CA, USA) und für 30 Minuten ein Proteinblocker (X0909, Dako, Carpinteria, CA, USA) aufgebracht. Anschließend konnte der Primär-Antikörper anti- α -smooth muscle actin (α -SMA, ab5694, abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:600 (Verdünnungsmedium, S3022, Dako, Carpinteria, CA, USA) bzw. anti-proliferating cell

nuclear antigen (PCNA, ab29, abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Sekundär-Antikörper behandelt. Für α -SMA wurde als sekundärer Antikörper Goat anti-Rabbit AP (D0487, Dako, Carpenteria, CA, USA) und für PCNA Goat anti-Maus AP (D0486, Dako, Carpenteria, CA, USA) verwendet. Danach wurden die Schnitte für 6-8 Minuten mit Permanent Red Chromogen (K0640, Dako, Carpenteria, CA, USA) behandelt, um die Zielantigene in der anschließenden Lichtmikroskopie zu identifizieren. Zum Abschluss wurden die immunhistochemisch behandelten Schnitte für 5 Minuten mit Hämalaun gefärbt, mit der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, zur Verdrängung des Alkohols mit X-TRA behandelt und mit dem X-TRA Kitt eingedeckt. Im Anschluss konnten die gefärbten Präparate unter dem Lichtmikroskop (BX51, Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan) ausgewertet werden. Für die Auswertung wurden die Dicke und die Fläche der Neointimabildung mit der Software Olympus cellSens Standard (Olympus K. K., Shinjuku, Präfektur Tokio, Japan) ermittelt und die α -SMA und PCNA positiven Zellen gezählt.



Abb. 11: Querschnitt durch die A. carotis nach FeCl_3 und Vehikel Behandlung. Die A. carotis wurde 3 Wochen nach der initialen Behandlung reseziert. Zunächst erfolgte die Färbung in Hämatoxylin-Eosin (HE) (A), um den maximalen Durchmesser und die Fläche der Neointima zu bestimmen. Zur immunhistochemischen Analyse erfolgten eine α -SMA (B) und PCNA Antikörpermarkierung (C), um die Zellaktivierung zu untersuchen.

6.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der *in vitro* und *in vivo* Daten erfolgte nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Varianzhomogenität (ANOVA) mit dem Students t-test und anschließender Bonferroni-Korrektur unter Verwendung der SigmaStat® Statistical Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Zunächst wurde zum Vergleich der Versuchsgruppen ein Holm-Sidak multipler Vergleichstest durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diesen nicht gegeben waren, erfolgte ein Rangsummen-Test (Kruskal-Wallis-Test) für unverbundene Stichproben mit einem sich anschließenden Dunn's Test. Unter der Verwendung der Software SigmaPlot® (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) wurden die Ergebnisse bei Normalverteilung in Säulendiagrammen als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$) bzw. bei nicht normalverteilten Ergebnissen in Boxplots als Median mit den 25%- und 75%-Quantilen sowie den Ausreißern dargestellt. Unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur wurden Unterschiede in den Ergebnissen ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich weiterer Signifikanzniveaus vorgenommen.

7 Ergebnisse

7.1 WST Assay

Anhand der Absorptionsabschwächungen der einzelnen Gruppen im Verhältnis zur Kontrollgruppe, welche 100% gesetzt wurde, war bei der Auswertung des WST Assays nach 3 Stunden zu erkennen, dass keine der Behandlungen relevante Unterschiede zur Kontrolle aufzeigten (Abb. 12). Somit geht weder vom H₂S Donor GYY, noch von dessen Vehikel bzw. von TNF- α eine relevante Zytotoxizität aus.

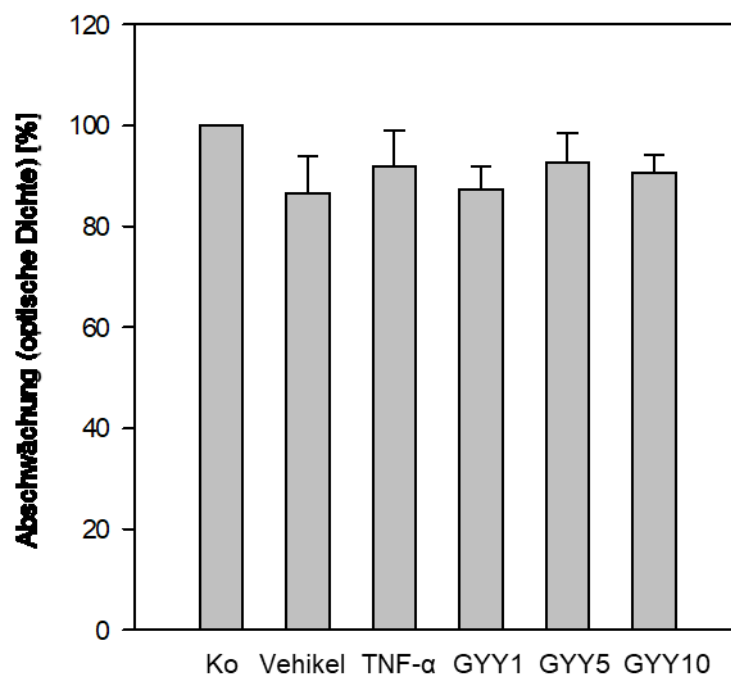


Abb. 12: Statistische Auswertung des WST Assays. Innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Absorptionsabschwächungen. Ko - Kontrolle. MW \pm SEM; ANOVA; n=4.

7.2 Durchflusszytometrie

In der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigten die ruhenden Endothelzellen eine äußerst geringe Expression von E-Selektin, ICAM-1 sowie von VCAM-1. Durch die pro-inflammatorische Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α ließ sich die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 signifikant steigern (Abb. 13A und 14A). Die

Exposition TNF- α aktivierter Endothelzellen mit GYY in aufsteigenden Konzentrationen führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Expression aller untersuchten Adhäsionsmoleküle. Die Expression von E-Selektin wurde dabei am stärksten beeinflusst und deutlich herunterreguliert. Die Applikation der geringsten GYY Konzentration von 1 mM führte zu keinem signifikanten Effekt der Adhäsionsmolekülexpression. Die Steigerung der GYY Konzentration auf 5 mM bzw. auf 10 mM reduzierte die Expression hingegen signifikant von $56,6 \pm 2,7\%$ TNF- α aktivierter Endothelzellen auf $39,2 \pm 3,4\%$ ($p=0,010$) bzw. auf $24,0 \pm 4,5\%$ ($p<0,001$, Abb. 14A). Wurden die HUVECs 24 Stunden nach der 10 mM GYY Exposition mit TNF- α stimuliert, so zeigte sich, dass die Zellen das Adhäsionsmolekül wie die unbehandelten Endothelzellen exprimierten ($p=0,758$, Abb. 13B).

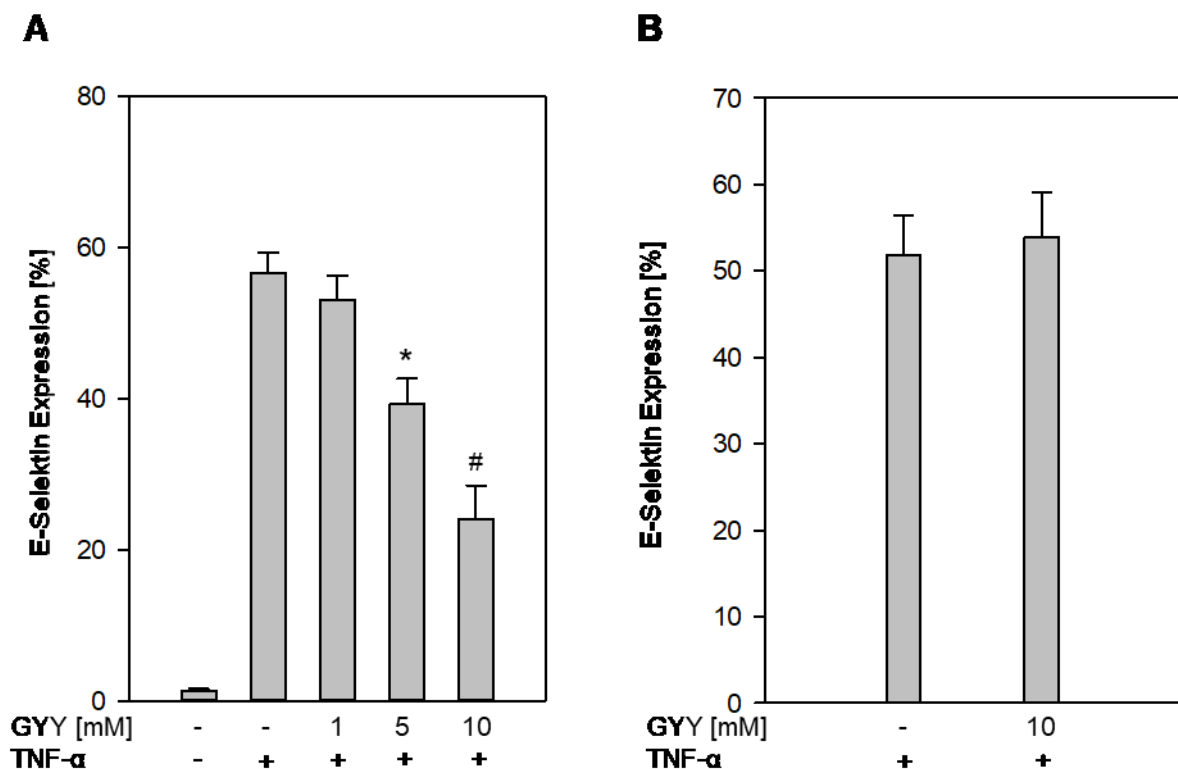


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der E-Selektin Expression humaner Endothelzellen. Die Endothelzellen wurden im ruhenden Zustand sowie nach Exposition mit TNF- α und steigenden GYY Konzentrationen auf die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin untersucht. Eine Stunde nach GYY Behandlung zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Expression von E-Selektin (A), wohingegen eine Stimulation 24 Stunden nach GYY Exposition keinen signifikanten Unterschied der E-Selektin Expression im Vergleich zur alleinigen TNF- α Aktivierung aufwies (B). MW \pm SEM; ANOVA; Dunn's Method; $n=6-9$; * $p<0,05$ vs TNF- α \emptyset GYY; # $p<0,001$ vs TNF- α \emptyset GYY.

Auf die ICAM-1 Expression hatte die Behandlung der TNF- α stimulierten Endothelzellen mit der höchsten GYY Konzentration ebenfalls einen deutlichen Effekt. Der mittlere Fluoreszenzshift wurde dabei durch Behandlung mit 10 mM GYY signifikant von $874,7 \pm 139,1$ nach TNF- α Stimulation auf $311,1 \pm 28,5$ reduziert ($p=0,014$, Abb. 15A). Die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 wurde durch die Applikation von 10 mM des H₂S Donors hingegen nur marginal von $91,9 \pm 6,7$ auf $77,6 \pm 5,1$ gesenkt ($p=0,384$, Abb. 14B).

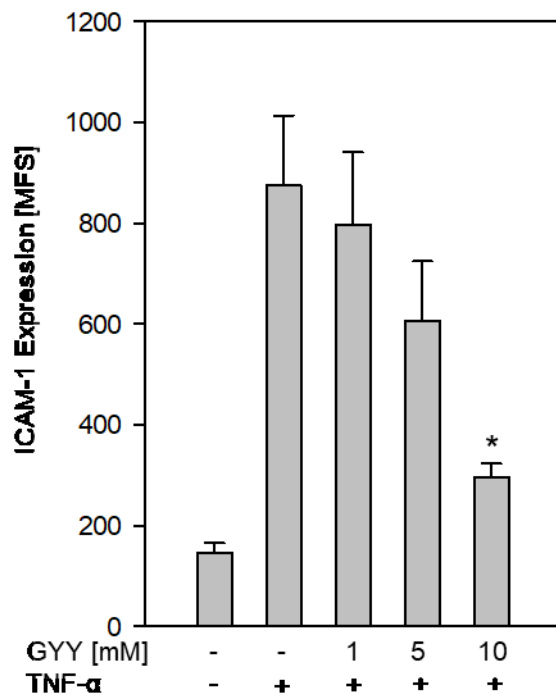
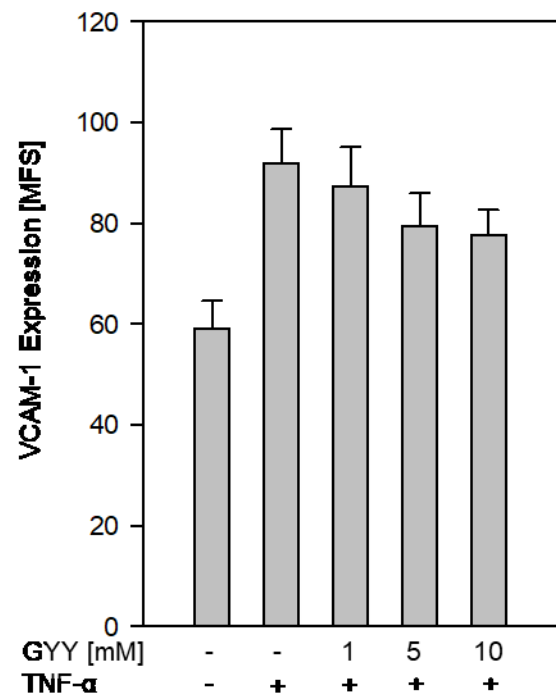
A**B**

Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der ICAM-1 und VCAM-1 Expression humaner Endothelzellen. Die Endothelzellen wurden im ruhenden Zustand sowie nach Exposition mit TNF- α und steigenden GYY Konzentrationen auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (A) und VCAM-1 (B) untersucht. Durch die Behandlung mit 1, 5 oder 10 mM GYY kam es zu einer signifikanten und dosisabhängigen Reduktion der ICAM-1 Expression (A). Demgegenüber wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 unter GYY Behandlung nur marginal beeinflusst (B). MW \pm SEM; ANOVA; Holm-Sidak; ICAM-1: $n=4-5$; * $p<0,05$ vs TNF- α \emptyset GYY; VCAM-1: $n=6-7$.

7.3 ELISA

Im ELISA zur Analyse der vWF Sekretion zeigte sich, dass es durch Stimulation der Endothelzellen mit Histamin zu einer Freisetzung des in den Weibel-Palade-Körperchen gespeicherten vWF kam. Die Freisetzung des vWF konnte durch die Aktivierung mit Histamin von 1,2 IU/ml (25%-Quantil: 1,0 IU/ml; 75%-Quantil: 3,6 ng/ml) im ruhenden Zustand auf 6,83 IU/ml (25%-Quantil: 4,73 IU/ml; 75%-Quantil: 9,95 IU/ml) gesteigert werden ($p < 0,05$). Durch die Behandlung mit dem H₂S Donor GYY, sowohl mit 5 mM als auch mit 10 mM, ließ sich die vWF Ausschüttung signifikant auf 1,65 IU/ml (25%-Quantil: 1,0 IU/ml; 75%-Quantil: 4,23 IU/ml) bzw. 1,45 IU/ml (25%-Quantil: 1,05 IU/ml; 75%-Quantil: 2,8 IU/ml) reduzieren ($p < 0,05$), was annähernd den Werten der Kontrollgruppe entspricht (Abb. 15).

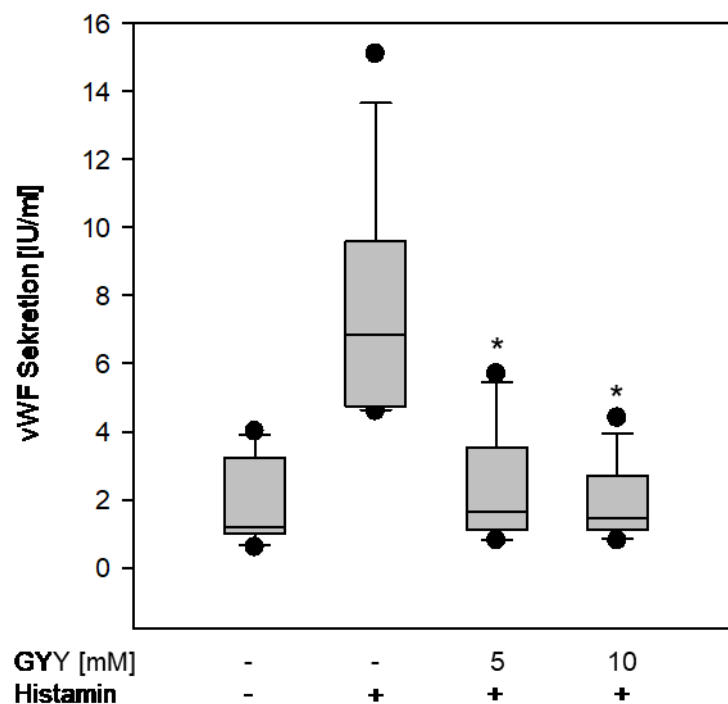


Abb. 15: Statistische Auswertung der vWF Sekretion. Die vWF Konzentration wurde im Medium humaner Endothelzellen untersucht. Dabei wurde die vWF Sekretion durch die GYY Behandlung signifikant reduziert. Median mit 25%- und 75%-Quantil; ANOVA; Dunn's Method; $n=7-8$; * $p < 0,05$ vs Histamin \emptyset GYY.

7.4 Biotin Switch Assay

In der quantitativen densitometrischen Analyse stellte sich dar, dass die Behandlung der HUVECs mit 1 mM GYY im Vergleich zur Vehikelgruppe zu einer signifikanten Steigerung der relativen Intensität des an SH-Gruppen gebundenen Proteins von 0,54 (25%-Quantil: 0,34; 75%-Quantil: 0,73) auf 2,72 (25%-Quantil: 1,49; 75%-Quantil: 3,07) führte ($p < 0,05$), welches die gesteigerte S-Sulfhydrierung endothelialer Proteine widerspiegelt. Die Analyse des Biotin Switch Assay erfolgte durch die spezifische Bindung von Biotin an sulfhydrierte Proteine, die im Westernblot sichtbar wurden. Durch die Steigerung der GYY Konzentration auf 5 und 10 mM konnte keine signifikante Zunahme der endothelialen Protein S-Sulfhydrierung erzielt werden (Abb. 16).

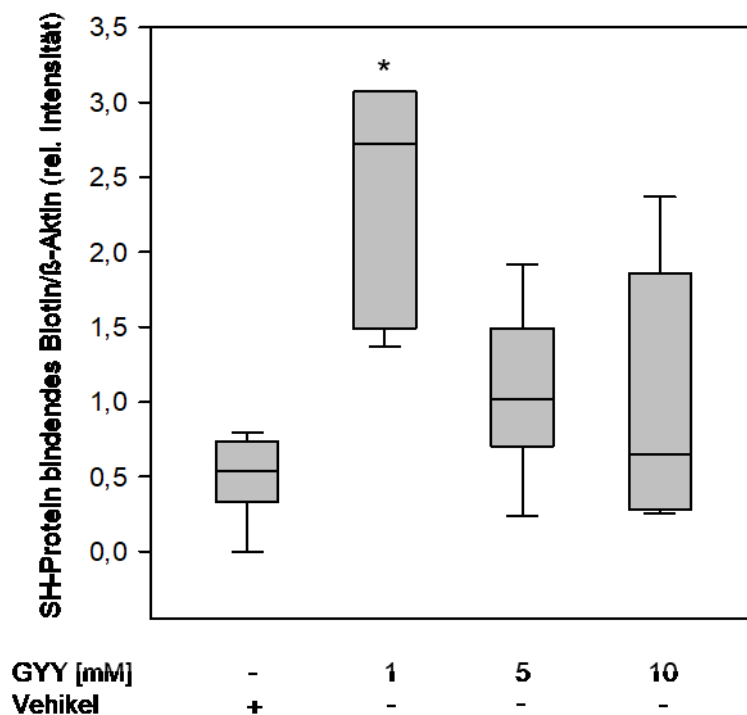


Abb. 16: Quantitative Densitometrie des Biotin Switch Assays von endothelialen Proteinen. Der Biotin Switch Assay erfolgte entsprechend des Protokolls von Mustafa et al. (2009). Statistisch wurde die relative Intensität sulfhydrierter Proteine ausgewertet, welche durch Exposition mit GYY 1 mM signifikant zunimmt. Median mit 25%- und 75%-Quantil; ANOVA; Holm-Sidak-Method; $n=5$; * $p < 0,05$ vs Vehikel \emptyset GYY.

7.5 Migrationsassay

In Abbildung 17 wird exemplarisch der Migrationsverlauf von unbehandelten, VEGF stimulierten sowie gleichzeitig mit GYY und VEGF behandelten Endothelzellen dargestellt. Anhand der mikroskopischen Bilder des Migrationsassays war deutlich zu erkennen, dass die mit VEGF behandelten Endothelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte Migration aufwiesen. Demgegenüber führte die gleichzeitige Behandlung mit VEGF und GYY, verglichen mit der alleinigen VEGF Stimulation, zu einer verzögerten Migration der Endothelzellen.

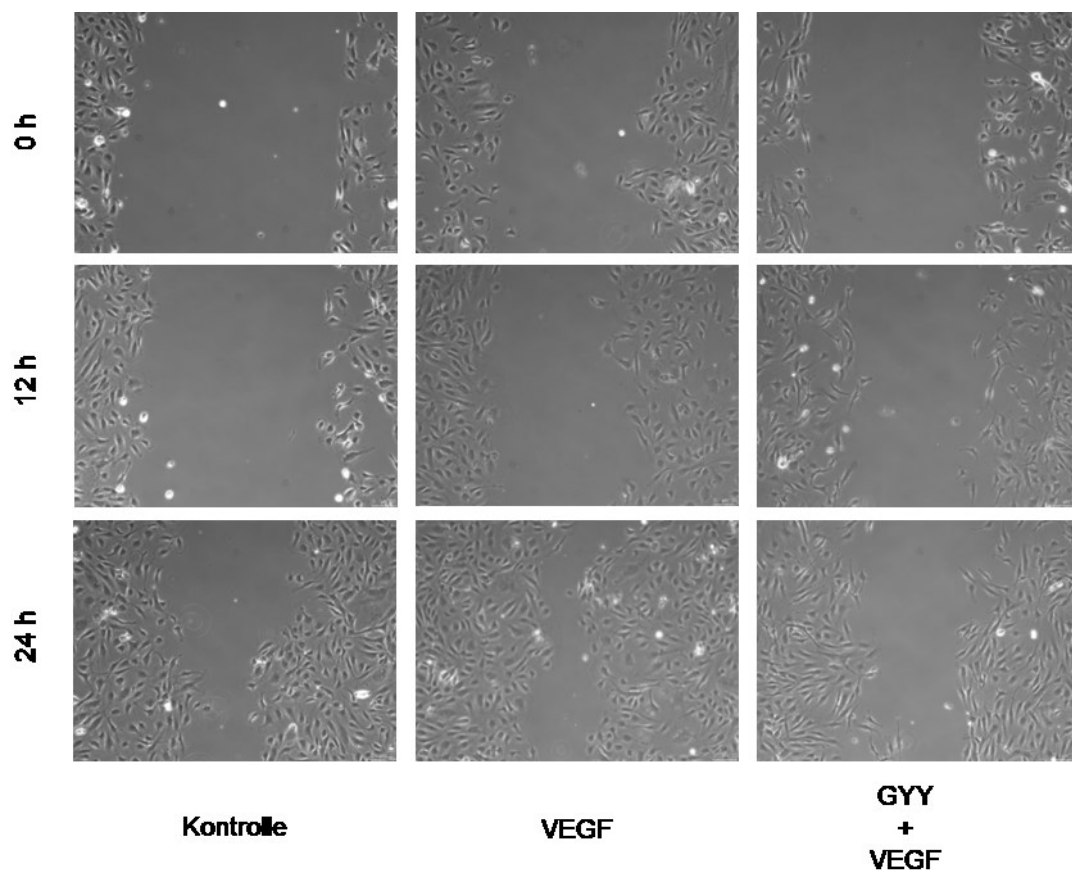


Abb. 17: Migration von HUVECs im ibidi® Migrationsassay. Darstellung der Migration humaner Endothelzellen im unbehandelten, mit VEGF stimulierten und gleichzeitig mit GYY und VEGF behandelten Zustand mittels Stereomikroskopie. Es war zu erkennen, dass die mit VEGF behandelten HUVECs, gegenüber der Kontrolle, eine beschleunigte Migration aufzeigten. Demgegenüber stellte sich der Migrationsverlauf der HUVECs, die mit GYY und VEGF gleichzeitig behandelt wurden, im Vergleich zur alleinigen VEGF Stimulation verzögert dar.

Bei der statistischen Auswertung der von HUVECs bedeckten Fläche nach 12 Stunden wurde bestätigt, dass der pro-angiogene VEGF Stimulus im Vergleich zu unbehandelten HUVECs zu einer signifikant gesteigerten Migration von $10,6 \pm 0,9\%$ auf $14,9 \pm 0,7\%$ ($p=0,012$) führte. Die isolierte Behandlung mit GYY schränkte das Migrationsverhalten der humanen Endothelzellen gegenüber dem unbehandelten Zustand ebenfalls signifikant auf $4,1 \pm 0,5\%$ ($p<0,001$) ein. Die simultane Applikation von VEGF und GYY wies mit $10,6 \pm 1,3\%$ wiederum einen Migrationsverhalten auf, das den unbehandelten Endothelzellen gleicht ($p=0,998$). Die Behandlung der HUVECs mit dem Vehikel hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen Effekt auf die Migration ($p=0,967$, Abb. 18).

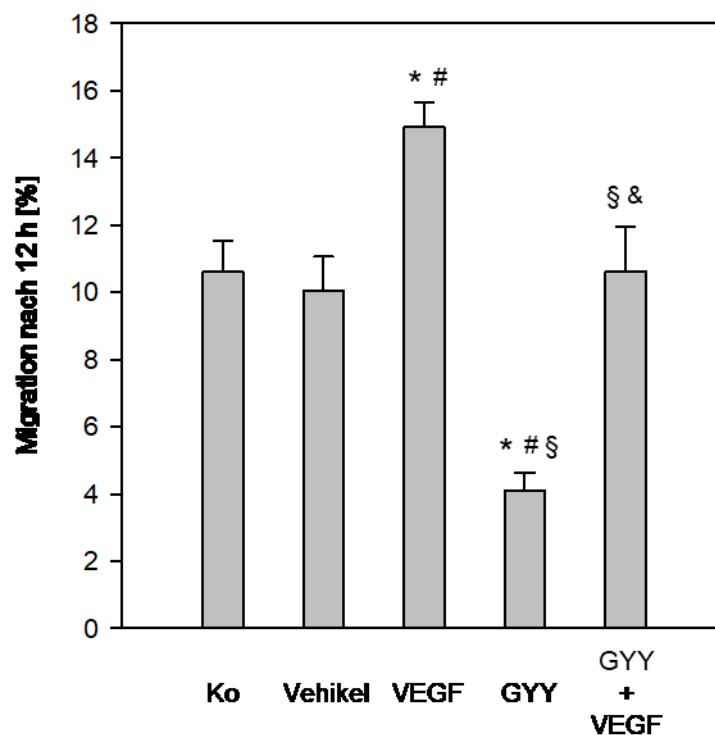


Abb. 18: Statistische Auswertung des Migrationsassays nach 12 Stunden. Die Behandlung mit dem Vehikel wies im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied auf. Der VEGF Stimulus führte zu einer signifikant gesteigerten Migration. Durch die alleinige GYY Behandlung kam es zu einer signifikant eingeschränkten Migration. Auch die simultane Behandlung mit VEGF und GYY führte zu einer signifikant verzögerten Migration im Vergleich zur alleinigen VEGF Stimulation. MW \pm SEM; ANOVA; Holm-Sidak; $n=3-5$; * $p<0,05$ vs Ko; # $p<0,05$ vs Vehikel; § $p<0,05$ vs VEGF; & $p<0,05$ vs GYY.

7.6 Neointimabildung

Die histologische Untersuchung der A. carotis in HE-Färbung zeigte, dass sowohl der maximale Durchmesser als auch die Fläche der Neointima signifikant durch die GYY Behandlung verkleinert wurde. Eine Woche nach der FeCl_3 Applikation zeigte sich der maximale Durchmesser der Neointima durch die GYY Behandlung von 128,27 μm (25%-Quantil: 93,71 μm ; 75%-Quantil: 163,76 μm) in Vehikel behandelten Tieren auf 43,34 μm (25%-Quantil: 36,92 μm ; 75%-Quantil: 50,33 μm) reduziert ($p < 0,05$). Auch nach drei Wochen war durch die einmalige Behandlung mit GYY ein signifikanter Effekt ($p < 0,05$) auf die Reduktion des Durchmessers von 153,97 μm (25%-Quantil: 100,47 μm ; 75%-Quantil: 250,1 μm) in Vehikel behandelten Mäusen auf 56,3 μm (25%-Quantil: 40,47 μm ; 75%-Quantil: 71,27 μm) zu verzeichnen (Abb. 19A). Die Fläche der Neointima der A. carotis konnte durch die GYY Behandlung ebenfalls nach einer Woche und nach drei Wochen im Vergleich zu den Vehikel behandelten Tieren reduziert werden (Abb. 19B). Nach einer Woche konnte eine Reduktion der Fläche von 26074,35 μm^2 (25%-Quantil: 16995,93 μm^2 ; 75%-Quantil: 28214,48 μm^2) auf 8590,16 μm^2 (25%-Quantil: 7877,64 μm^2 ; 75%-Quantil: 10131,72 μm^2) gemessen werden ($p = 0,039$). Nach 3 Wochen erreichte die Neointima in der Vehikelgruppe eine Fläche von 73500,1 μm^2 (25%-Quantil: 48545,5 μm^2 ; 75%-Quantil: 75705,06 μm^2), welche durch die einmalige Behandlung mit GYY auf 14070,58 μm^2 (25%-Quantil: 9751,66 μm^2 ; 75%-Quantil: 22828,82 μm^2) verkleinert werden konnte ($p < 0,001$). Insgesamt kann somit auf eine Reduktion der Neointimabildung durch die GYY Applikation geschlossen werden.

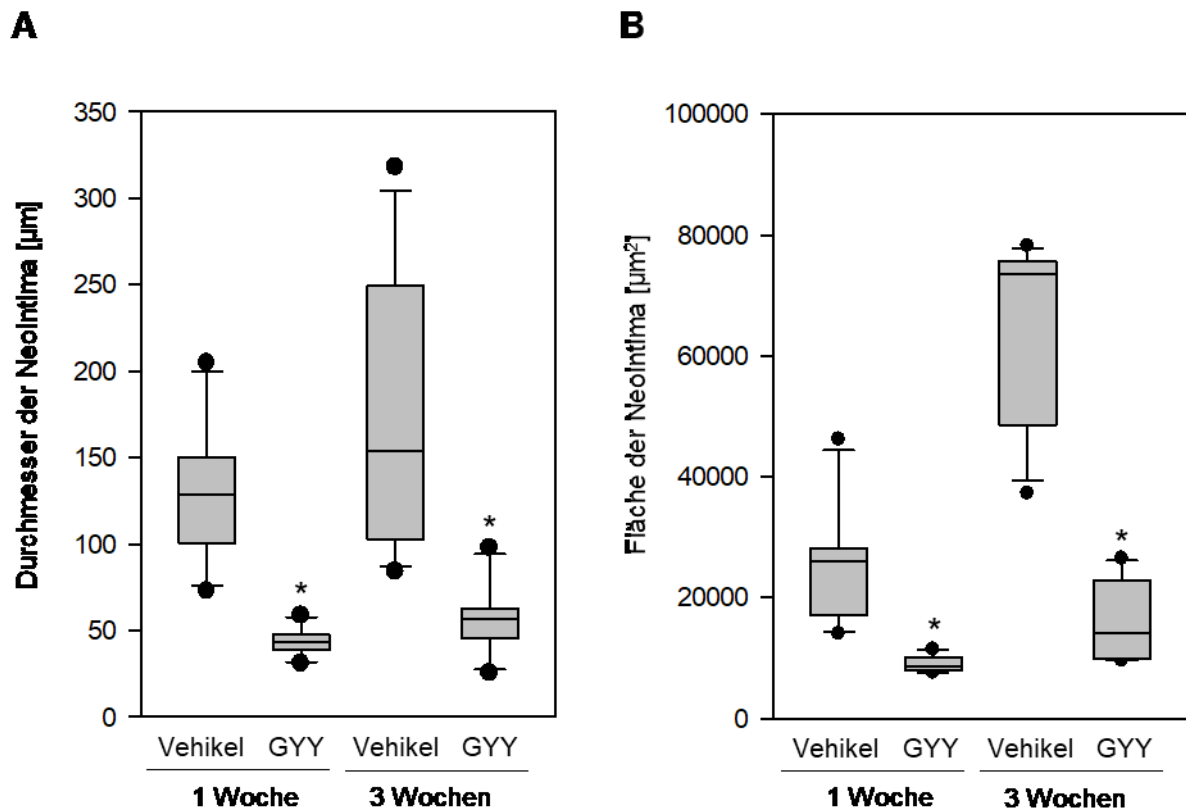


Abb. 19: Statistische Auswertung der Neointimabildung. Die Auswertungen des maximalen Durchmessers (A) und der Fläche (B) zeigten durch die einmalige GYY Behandlung sowohl nach einer Woche als auch nach drei Wochen eine signifikante Abnahme beider Parameter. Median mit 25%- und 75%-Quantil; ANOVA; Dunn's Method (A); Holm-Sidak (B), $n=6-7$; * $p<0,05$ vs Vehikel 1 Woche bzw. Vehikel 3 Wochen.

7.7 Immunhistochemie

Während die immunhistochemischen Analysen nach einer Woche nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen behandelten Versuchsgruppen aufwiesen, war nach drei Wochen eine Signifikanz hinsichtlich der α -SMA positiven und der PCNA positiven Zellen gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Anhand der Vehikelgruppe zeigte sich, dass die Anzahl der α -SMA positiven und der PCNA positiven Zellen innerhalb der Neointima zwischen der ersten und dritten Woche nach der FeCl_3 Applikation signifikant anstieg ($p<0,05$). Jedoch kam es auch innerhalb der mit GYY behandelten Gruppe zwischen Woche eins und Woche drei zu einem signifikanten Anstieg der α -SMA positiven Zellen von $11,3 \pm 0,8$ Zellen auf $18,2 \pm 2,2$ Zellen ($p=0,015$). Allerdings konnte der Anstieg der α -SMA positiven Zellen der Neointima nach drei Wochen im Vergleich zur Vehikelgruppe durch die Behandlung mit dem

H₂S Donor GYY von $35,4 \pm 4,1$ Zellen auf $18,2 \pm 2,2$ Zellen abgeschwächt werden ($p=0,005$, Abb. 20A). Die PCNA positiven Zellen konnten nach drei Wochen ebenfalls durch die GYY Behandlung von $13,0 \pm 1,1$ Zellen auf $5,3 \pm 1,7$ Zellen reduziert werden ($p=0,002$, Abb. 20B). Außerdem sind die PCNA positiven Zellen im Gegensatz zu den α -SMA positiven Zellen im Verlauf der GYY Behandlung, zwischen der ersten und dritten Woche, nicht signifikant gestiegen ($p=0,803$).

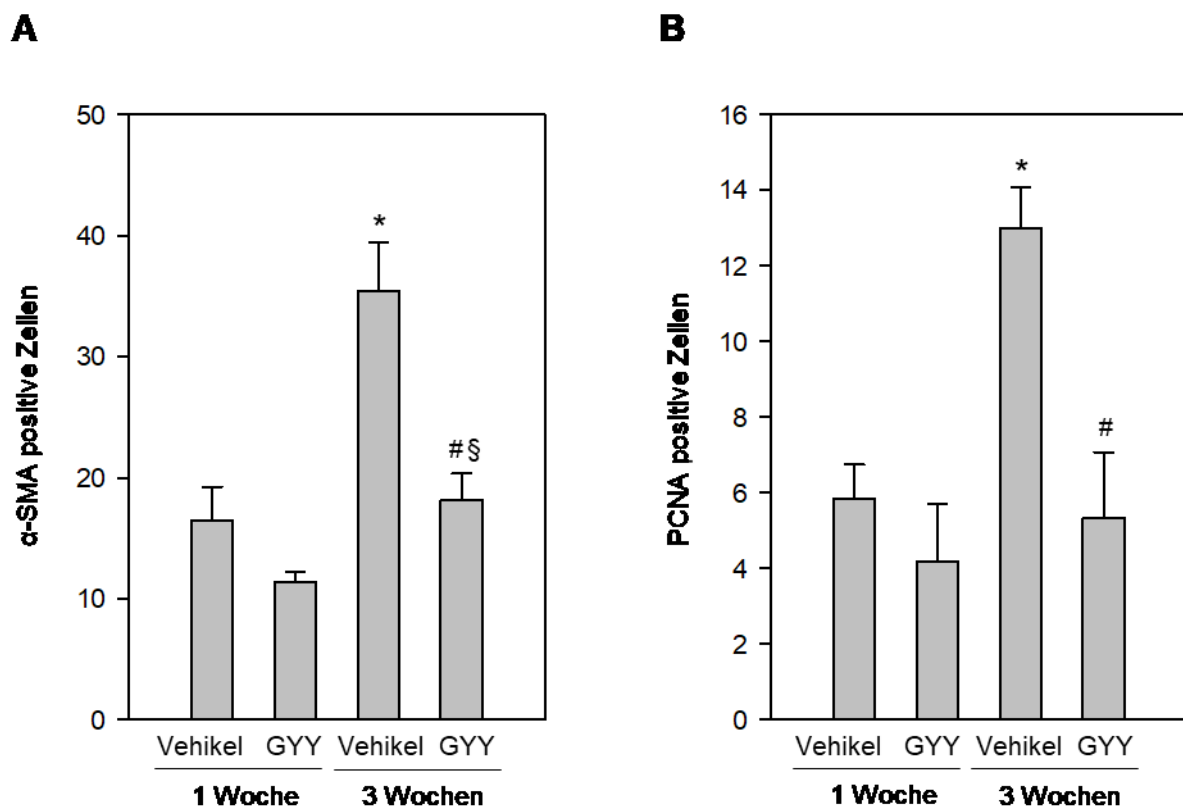


Abb. 20: Statistische Auswertung der Immunhistochemie. Die GYY Behandlung führte nach 3 Wochen zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der α -SMA positiven Zellen (A) sowie der PCNA positiven Zellen (B) gegenüber der jeweiligen Behandlung mit dem Vehikel. MW \pm SEM; ANOVA; t-test mit Bonferroni-Korrektur; $n=6-8$; * $p<0,05$ vs Vehikel 1 Woche; # $p=0,005$ vs Vehikel 3 Wochen; § $p=0,015$ vs GYY 1 Woche (A). Holm-Sidak; $n=6-8$; * $p<0,05$ vs Vehikel 1 Woche; # $p=0,002$ vs Vehikel 3 Wochen (B).

8 Diskussion

8.1 Diskussion von Material und Methodik

8.1.1 Hydrosulfid Donor GYY4137

GYG ist ein langsam und kontinuierlich H_2S freisetzender Donor, welcher im Vergleich zu den Sulfidsalzen Na_2S und NaHS über eine Pharmakokinetik verfügt, die die physiologischen Gegebenheiten der endogenen, konstanten H_2S Freisetzung besser widerspiegelt (Li et al. 2008). Die Liberation von H_2S aus GYG ist von der Temperatur und dem pH Wert abhängig. Die erhöhten H_2S Plasmakonzentrationen können für mindestens 180 Minuten aufrechterhalten werden (Li et al. 2008). Im Vergleich zu NaHS induziert GYG keine DNA Schäden und führt nicht zum programmierten Zelltod (Yang et al. 2004, Baskar et al. 2007), was durch die unterschiedlichen Freisetzungsmechanismen der H_2S Donatoren erklärt werden könnte (Li et al. 2008). Eine Studie zeigte außerdem, dass eine schnelle Freisetzung von H_2S aus NaHS eher pro-inflammatorische Wirkungen induziert, wohingegen eine langsame, kontinuierliche Freisetzung aus GYG hauptsächlich entzündungshemmende Wirkungen hervorruft (Whiteman et al. 2010). In den letzten Jahren hat der H_2S Donor GYG aufgrund seiner Imitation der annähernd physiologischen H_2S Freisetzung ein beträchtliches Interesse in der Forschung geweckt und wurde in zahlreichen Studien verwendet, um die Effekte von H_2S auf verschiedenste Organsysteme, wie z.B. das Herz und die Nieren zu evaluieren. Dabei kam es u.a. zu einem verbesserten Outcome nach myokardialen Reperfusionsschäden (Meng et al. 2015) und zu einer Protektion vor Myokardfibrose (Meng et al. 2015). Des Weiteren konnte durch den Einsatz von GYG nach der Induktion einer einseitigen Harnwegsobstruktion, gemessen anhand der Retentionsparameter, eine geringere Nierenschädigung erzielt werden. Zudem wurde histologisch der kortikale Verlust, die inflammatorische Schädigung sowie die tubulointerstitielle Fibrose gemildert (Lin et al. 2016), weshalb H_2S ebenfalls ein nephroprotektiver Charakter zugeschrieben werden kann.

8.1.2 WST Assay

Wasserlösliche Tetrazoliumsalze, wie WST-1, sind Verbindungen, die aus einem positiv geladenen quartären Tetrazolringkern bestehen, welcher vier Stickstoffatome, die von drei aromatischen Gruppen umgeben sind, enthalten (Berridge et al. 2005). Sie stellen breit genutzte Farbstoffe in Zellproliferationsassays dar. Der WST-1 Assay ist ein etabliertes Testsystem zur Beurteilung einer potentiellen Zytotoxizität verschiedenster Stoffe und findet seinen Einsatz zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen. Der schwach rötliche Farbstoff WST-1 wird dabei mit Hilfe des Enzyms Succinat-Tetrazolinium-Reduktase zum dunkelroten Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoff gespalten. Da dieses Enzym ausschließlich Bestandteil der Atmungskette in den Mitochondrien ist, dient es zum Nachweis einer intakten Atmungskette und ist somit nur in lebensfähigen Zellen aktiv.

H₂S wurde in zahlreichen Studien als toxisches Gas beschrieben (Smith & Gosselin 1979, Olson 2011) und gilt in hohen Konzentrationen, nach Kohlenmonoxid, als zweitwichtigste Ursache für gasbedingte Todesfälle am Arbeitsplatz (Guidotti 2010, Woodall et al. 2005). Daher wurde zunächst mittels eines WST-1 Assays eine Zytotoxizität des H₂S Donors GYY in den Konzentrationen 1, 5 und 10 mM ausgeschlossen. Durch diese Konzentrationen wurde eine H₂S Plasmakonzentration von etwa 5, 25 bzw. 50 µM erreicht (Li et al. 2008), die annähernd die physiologischen Bedingungen widerspiegeln, denn laut einer Studie von Whiteman und Moore liegt der physiologische H₂S Plasmaspiegel zwischen 34 µM und 65 µM (Whiteman & Moore 2009).

8.1.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt seit Jahrzehnten ein wichtiges Forschungsinstrument der Zytologie, Genetik, Mikrobiologie und Immunologie dar. Sie dient der Unterscheidung und Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen bezüglich ihrer biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften. Dabei werden die Zellen, während sie einzeln und hintereinander durch eine Messkammer fließen, von einem Laser angestrahlt. Daraufhin entsteht ein von den Zellen ausgehendes Streulicht, das für jede Zellpopulation individuell

charakteristisch ist. Die Lichtstreuung wird dabei als Vorwärtsstreuung (FSC) zur Größenbestimmung der Zelle und als Seitwärtsstreuung (SSC) zur Detektion der intrazellulären Granularität erfasst. Diese Methode lässt sich mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern kombinieren. Dadurch lassen sich neben der Zellpopulation auch bestimmte Strukturen auf Zellmembranen darstellen und stehen für eine quantitative Auswertung bereit. Diese Methodik wurde in der vorliegenden Studie genutzt, um die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle zu analysieren.

8.1.4 ELISA

Der ELISA ist ein immunologisches Testverfahren und basiert auf einer enzymkatalysierten Farbreaktion einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Sandwich-ELISA stellt eine Methode dar, die dem Nachweis hochmolekularer Verbindungen dient, bei der das Enzym, das die Farbreaktion katalysiert, an einen sekundären monoklonalen Antikörper gebunden ist. Das Antigen muss dafür über zwei Antikörperbindungsstellen verfügen. Diese Voraussetzung wird von dem vWF erfüllt und somit konnte das Human ELISA Kit (ab189571, abcam, Cambridge, UK), das auf der Methode des Sandwich-ELISA basiert und bereits in anderen Studien Anwendung fand (Chan et al. 2014), der quantitativen Messung der vWF Konzentration dienen.

8.1.5 Biotin Switch Assay

Mit Hilfe eines Biotin Switch Assays wurden ursprünglich S-nitrosylierte Proteine detektiert, indem freie Thiole durch eine hochspezifische freie Sulfhydryl-reaktive Verbindung (MMTS) blockiert werden und Biotin somit ausschließlich an -SNO-Gruppen bindet (Jaffrey & Snyder 2001, Jaffrey et al. 2001). Durch Modifikationen des Biotin Switch Assays nach Mustafa et al. lässt sich durch ein ähnliches Prinzip der Biotinylierung an -SSH-Gruppen ebenfalls eine S-Sulfhydrierung der Proteine detektieren (Mustafa et al. 2009), welche durch H_2S vermittelt wird und einen der Wirkmechanismen von H_2S darstellt. Anschließend wird die Biotinylierung

der S-sulphydrierten Proteine durch anti-Biotin-Antikörper sichtbar gemacht und quantitativ ausgewertet.

8.1.6 Migrationsassay

Migration und Motilität sind Schlüsseleigenschaften und essentielle Merkmale von lebenden Zellen. Zellmigration ist an wesentlichen Mechanismen des Lebens, wie z.B. der Konzeption, der embryonalen Entwicklung, der Immunantwort, der transendothelialen Extravasation von Leukozyten und auch an diversen pathologischen Prozessen beteiligt (Lauffenburger & Horwitz 1996, van Buul & Hordijk 2004). Daher sind Methoden zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen bedeutungsvolle Instrumente der Forschung.

Um das Migrationsverhalten der humanen Endothelzellen zu untersuchen, wurde ein gut etablierter Wundverschluss Assay (Justus et al. 2014) durchgeführt und dazu ein Culture-Insert verwendet, um die Oberfläche der Zellkulturplatten vor Beschädigungen durch eine Pipettenspitze zu schützen und die artifizielle Wundgröße einheitlich zu gestalten und so Messfehlern vorzubeugen.

8.1.7 *In vivo* FeCl₃-Thrombosemodell

8.1.7.1 C57BL/6J-Tyr Maus

C57BL/6 Mäuse stellen aufgrund des vollständig entschlüsselten Genoms und der damit einhergehenden Möglichkeit der gezielten genetischen Modifikation einen populären Inzuchtstamm für Laborversuche dar. Die weit verbreitete Nachfrage resultierte jedoch in der Bildung mehrerer B6-Substämme, wie C57BL/6J und C57BL/6N, mit unterschiedlichen Phänotypen. Die Substämme sind miteinander verwandt, jedoch nicht genetisch identisch, was sich in unterschiedlichen Verhaltensmustern der Tiere widerspiegelt (Bothe et al. 2004, Bryant et al. 2008). Der co-isogene C57BL/6J-Tyr Stamm enthält eine Mutation im Tyrosinase-Gen, die bei homozygoter Mutation durch Inhibierung der Melaninsynthese zu einem vollständigen Fehlen des Pigments in Haar, Haut und Auge und somit zu einer weißen Fellfarbe und roten Augen führt (Le Fur et al. 1996).

Für das FeCl₃-Thrombosemodell wurden ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet, um fluktuierende Ergebnisse durch den Einfluss von Östrogenschwankungen im Hormonzyklus weiblicher Tiere zu vermeiden.

8.1.7.2 Narkose

Die Durchführung der Schädigung der A. carotis communis mit Hilfe des FeCl₃-Modells (Kurz et al. 1990, Tseng et al. 2006) und die intravenöse Injektion von H₂S bzw. des Vehikels machen die Anästhesie der Versuchstiere unvermeidlich. Die verwendete Anästhesiemethode mit Kombination von Ketamin und Xylazin stellt in tierexperimentellen Versuchen ein weit verbreitetes und etabliertes Narkoseverfahren dar.

Ketamin fand seinen ersten Einsatz beim Menschen im Jahr 1964 und wurde als dissoziatives Anästhetikum beschrieben (Domino et al. 1965). Es vermittelt seine Wirkung über eine nichtkompetitive Hemmung der Phencyclin-Bindungsstelle von NMDA-Rezeptoren (Davies et al. 1988) und führt durch Blockade der Acetylcholin Freisetzung zu einer schnellen Bewusstlosigkeit. Heute ist Ketamin für seine große therapeutische Breite, die suffiziente Analgesie und gute Kompatibilität mit anderen Medikamenten bekannt (Mion & Villeveille 2013). Durch Verstärkung der Wirkung von Katecholaminen führt Ketamin zu einer Stimulation und Stabilisierung des Herz-Kreislaufsystems während der Anästhesie. Es findet jedoch auch bei behandlungsresistenter Depression Anwendung (Berman et al. 2000, Zarate et al. 2006) und wird als schnellwirksames Antidepressivum für Patienten mit akuter Suizidalität empfohlen (Zarate & Niciu 2015).

Xylazin ist ein direkter α 2-Adrenozeptor-Agonist und wurde ursprünglich als Antihypertensivum entwickelt. Jedoch bewirkt es zudem eine Sedierung, leichte bis moderate Analgesie und im Gegensatz zu Ketamin auch eine Muskelrelaxation (Dittmar et al. 2004). Unerwünschte Nebenwirkungen von Xylazin können Herz-Kreislauf- und Atemdepression (Dittmar et al. 2004) sowie akute Hyperglykämie (Saha et al. 2005) und ausgeprägte Diurese (Greene & Thurmon 1988) sein.

8.1.7.3 Modell der FeCl₃-Schädigung

Thrombotische Herz-Kreislaufkrankungen stellen in den Industrieländern die häufigste Ursache für Behinderungen und Todesfälle dar (Sanz et al. 2012, Abegunde et al. 2007). *In vitro* Modelle können den komplexen Hintergrund der Thromboseentstehung und dessen Beeinflussung durch extrinsische Faktoren, wie Hormone, Zytokine, zirkulierende Blutzellen und oxidativen Stress (Libby 2002, Fearon & Faux 2009) nicht adäquat genug widerspiegeln, so dass *in vivo* Studien an Tiermodellen entscheidend sind, um ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen von thrombotischen Störungen zu ermöglichen (Westrick et al. 2007, Vilahur et al. 2011). Daher wurden diverse tierexperimentelle Verfahren zur Thromboseinduktion entwickelt. Dazu gehören u.a. laserinduzierte Thrombosen (Rosen et al. 2001), die ihren Ursprung bereits 1969 fanden (Arfors et al. 1969), Plaquemodelle mit Hilfe von Apo-E-defizienten Mäusen (Nakaschima et al. 1994) oder cholesterin- und fettreiche Diäten (Breslow 1996) sowie mechanisch induzierte Thrombosemodelle durch Ligatur (Singh et al. 2003) und Platzierung einer Polyethylenmanschette (Sasaki et al. 2004).

Im Jahr 1944 wurde FeCl₃ zum ersten Mal zur Induktion einer Thrombose der V. cava inferior des Kaninchens eingesetzt (Reimann-Hunziker 1944). Viele Jahre später wurde die Methode auf die A. carotis der Ratte (Kurz et al. 1990) und anschließend auf die Spezies der Maus (Farrehi et al. 1998) übertragen. Heute stellt der FeCl₃ induzierte Gefäßschaden ein weit verbreitetes Thrombosemodell dar (Day et al. 2004, Whinna 2008).

Es wird allgemein vermutet, dass FeCl₃ einen starken oxidativen Stress mit der Erzeugung freier Radikale verursacht (Li et al. 2013). Die Anwendung auf der Adventitia des Gefäßes führt zu einem vesikelgetragenen endozytisch-exozytischen Transport der Eisenionen zur luminalen Oberfläche und verursacht somit eine Endothelverletzung und anschließende Thrombusbildung (Tseng et al. 2006, Eckly et al. 2011). Jüngere Studien zeigten weitere mögliche zugrundeliegenden Mechanismen, wie die Adhäsion roter Blutkörperchen an die geschädigte Gefäßwand (Barr et al. 2013) sowie den physiochemischen Effekt der FeCl₃ induzierten Aggregation von Plasmaproteinen und Blutzellen (Ciciliano et al. 2015). Diese

neuen Erkenntnisse sprechen dafür, dass die potentiellen Mechanismen dieses Modells viel komplexer sind als bisher vermutet. Außerdem ist über die pathophysiologischen Mechanismen der Effekte des FeCl_3 auf die Media und Adventitia wenig bekannt, sodass das Modell bislang insgesamt schlecht verstanden bleibt.

Jedoch ist das FeCl_3 -Thrombosemodell einfach durchzuführen und reagiert sowohl auf Antikoagulantien als auch auf Thrombozytenaggregationshemmer sensibel, sodass dieses Modell in der Analyse von potentiellen Hämostase-beeinflussenden Mediatoren etabliert ist (Leadley et al. 1999, Konstantinides et al. 2001, Marsh et al. 1998). Es bietet durch präzise Kontrolle von FeCl_3 Konzentration, Größe des Arteriensegments und Dauer der Schädigung eine identische Übertragung von Tier zu Tier und somit eine einheitliche Induktion der Neointimabildung (Farrehi et al. 1998). Da FeCl_3 keinen zirkumferentiellen Gefäßschaden verursacht, wird die Thromboseinduktion ohne vollständige Zerstörung der Gefäßzellen, die eine nachfolgende Thrombolyse vermitteln, ermöglicht. Des Weiteren wird ein kompletter Gefäßverschluss im murinen Modell aufgrund von ausgeprägten Kollateralen gut toleriert (Farrehi et al. 1998).

8.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des H_2S Donors GYY auf die Aktivität, die Protein S-Sulphydrierung und das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen *in vitro* sowie auf die Neointimabildung *in vivo* untersucht.

Mithilfe eines WST Assays konnte eine Zytotoxizität des verwendeten H_2S Donors in den entsprechenden Konzentrationen und der weiteren Metabolite ausgeschlossen werden, sodass der Einsatz der in dieser Studie verwendeten Konzentrationen von H_2S als unbedenklich angesehen werden kann.

Obwohl die Gerinnungskaskade und die beteiligten Faktoren während der Thrombogenese gut untersucht und verstanden sind, wurden diese noch nicht ausreichend hinsichtlich einer möglichen pharmakologischen Beeinflussung, wie z.B. durch H_2S , untersucht und benötigen daher weitere Analysen.

Ein als wahrscheinlich angesehener Mechanismus des anti-thrombogenen Effektes des H₂S Donors GYY ist die Beeinflussung der Endothel-Thrombozyten-Interaktion während der primären Hämostase sowie der Endothel-Leukozyten-Interaktion. Das Binden von Thrombozyten und Leukozyten an Endothelzellen bzw. subendotheliale Strukturen im Bereich einer Gefäßwandläsion oder einer Gefäßentzündung wird wesentlich über Adhäsionsmoleküle dieser Zellen erreicht. Die in dieser Studie durchflusszytometrisch untersuchten Adhäsionsmoleküle stellen entscheidende Strukturen dar, welche die primäre Hämostase sowie Entzündungsreaktionen vermitteln, indem sie die Wechselwirkungen der Gefäßwand mit zirkulierenden Blutplättchen und Leukozyten vermitteln (Wakefield et al. 2008).

E-Selektin ist ein Glykoprotein, das auf aktiviertem Endothel exprimiert wird und die Thrombogenese erleichtert, indem es die Neutrophilen- und Monozytenaktivität direkt moduliert. Außerdem wurde E-Selektin auch als wichtiger Regulator der Thrombusbildung und des Fibringehalts im murinen Thrombosemodell identifiziert (Myers et al. 2002, Sullivan et al. 2003). Es wurde weiterhin gezeigt, dass die Deletion von E-Selektin und die kombinierte P- und E-Selektin Deletion mit einer verringerten Thrombogenese einherging, während zusätzlich die Entzündungsreaktion in der Venenwand stark gehemmt wurde (Myers et. al 2002). ICAM-1 vermittelt die Bindung von Leukozyten an Endothelzellen, wodurch die Leukozyten während einer Immunreaktion in das Gewebe wandern können (Frank & Lisanti 2008). Erhöhte ICAM-1 Spiegel im Serum stellen einen Marker für die lokale Endothel- und Leukozytenaktivität dar und sind an der Bildung einer Thrombose von kleinen Gefäßen und einer TVT großer Gefäße unter septischen Bedingungen im Mausmodell beteiligt (Darbousset et al 2012, Obi et al. 2017). Ferner erhöht lösliches ICAM-1 das Risiko für ein postthrombotisches Syndrom und spiegelt dessen Schweregrad wider (Shbaklo et al. 2009, Rabinovich et al 2015). Experimentell ist der Beitrag von VCAM-1 zur Entwicklung einer Thrombose zwar unklar, jedoch deuten klinische Daten darauf hin, dass der Plasmaspiegel während der Präsenz einer *in vivo* Thrombose erhöht ist (Quarmby et al. 1999, Smith et al. 1999). Da die Thrombose auch immer mit einer sterilen, lokalen

Entzündung verbunden ist, kann angenommen werden, dass auch VCAM-1 einen pathophysiologischen Mechanismus während der Thrombogenese einnimmt. Diese beschriebenen Adhäsionsmoleküle sind jedoch nicht nur an der Thrombogenese, sondern auch an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt (Chia 1998, Ley & Huo 2001, Blankenberg et al. 2003, Galkina & Ley 2007), wodurch ihre Beeinflussung neben anti-thrombogenen zusätzlich mit anti-atherogenen Effekten einhergehen könnte.

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich anhand der Intensität der Antikörperbindung bzw. des mittleren Fluoreszenzshifts, dass durch Vorbehandlung TNF- α stimulierter HUVECs mit GYY eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 erzielt werden konnte. Die Expression von VCAM-1 wurde hingegen nur marginal durch die Anwendung von GYY reduziert. Allerdings konnte die Expression des Adhäsionsmoleküls durch den pro-inflammatorischen Stimulus mit TNF- α , im Vergleich zu der Expression von E-Selektin und ICAM-1, nicht aussagekräftig gesteigert werden, so dass dies eine Erklärung für den in dieser Studie nur mäßigen Effekt von GYY auf die VCAM-1 Expression sein könnte. Des Weiteren konnte erstmalig anhand der Expression von E-Selektin gezeigt werden, dass der Effekt des H₂S Donors GYY reversibel ist, was eine essentielle Eigenschaft für den potentiellen Einsatz des volatilen Mediators als Pharmakon darstellt.

Es wurde bereits im Jahr 2009 herausgefunden, dass der H₂S Donor NaHS in Apolipoprotein-E Knockout Mäusen und HUVECs über die Inhibition der Kerntranslokation des NF- κ B Signalwegs zu einer verminderten ICAM-1 Expression führt und die atherosklerotische Läsionsfläche im Mausmodell verkleinert wird (Wang et al. 2009), was wiederum einer anti-atherogenen Wirkung entspricht. Kurze Zeit später konnten diese Erkenntnisse auch für weitere Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin und VCAM-1, gezeigt werden. Dabei nahm der durch TNF- α induzierte Anstieg der mRNA Expression von ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin und E-Selektin und in einem weiteren Schritt der Proteinexpression von ICAM-1 und VCAM-1 durch die Behandlung mit NaHS signifikant ab (Pan et al. 2011). Außerdem wurden in der Studie bereits Wirkmechanismen von H₂S identifiziert. Dazu

gehören zum einen die Reduktion der durch TNF- α stimulierten intrazellulären ROS-Produktion und zum anderen die Hemmung der NF- κ B und p38 Signalwege sowie die Hochregulierung der HO-1 Expression (Pan et al. 2009). Dies resultiert in einer verminderten Adhäsionsmolekülexpression und wirkt folglich entzündungshemmend und einer progredienten endothelialen Dysfunktion entgegen.

Nun wurde in dieser Studie gezeigt, dass auch der H₂S Donor GYY die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle in HUVECs reduziert und somit die endotheliale Aktivität herabsetzt und einen protektiven Einfluss auf die Pathogenese der Thromboseentstehung sowie der Atherosklerose ausübt. Darüber hinaus könnte durch die Behandlung mit GYY das Risiko für die Entstehung eines postthrombotischen Syndroms über die Reduktion der ICAM-1 Spiegel im Serum durch die Behandlung mit GYY abgeschwächt werden.

Neben der Verringerung von oxidativem Stress und Modulation von Signalwegen stellt die posttranslationale Modifikation von Proteinen, wie z.B. die Protein S-Sulfhydrierung, einen weiteren Wirkmechanismus von H₂S dar (Kabil & Banerjee 2010, Fukuto et al. 2012, Predmore et al. 2012, Mustafa et al. 2009, Grambow et al. 2014). So wurde unter Verwendung des Biotin Switch Assays auch in dieser Studie eine signifikante Steigerung der S-Sulfhydrierung endothelialer Proteine durch Applikation von GYY nachgewiesen. Eine Dosisabhängigkeit war im Gegensatz zu den durchflusszytometrischen Analysen jedoch nicht zu finden. Die Anzahl der vorhandenen Cysteinreste könnte einen limitierenden Faktor für die Protein S-Sulfhydrierung darstellen, sodass bereits durch die niedrigste GYY Konzentration ein Großteil der Cysteinreste sulfhydriert wird. Dies könnte eine mögliche Ursache für die fehlende Dosisabhängigkeit sein. Daraus lässt sich jedoch auch schließen, dass GYY mehrere Wirkmechanismen zur gleichen Zeit entfalten könnte und seine Wirkung in unterschiedlichen Konzentrationen über die verschiedenen Mechanismen ausübt. In dem Versuch bleibt außerdem ungeklärt, welche der endothelialen Proteine in welcher Intensität und an welcher Position sulfhydriert werden. Es konnte jedoch rezent gezeigt werden, dass die Expression des endothelialen Adhäsionsmoleküls E-Selektin indirekt über die S-Sulfhydrierung des RNA-bindenden Proteins Human Antigen R (HuR) vermindert wird (Bibli

et al. 2019), da die E-Selektin mRNA Spiegel durch HuR reguliert werden (Ceolotto et al. 2014). Außerdem induziert H_2S die Keap1 S-Sulfhydrierung (Kelch-like ECH-associated protein 1) und unterdrückt somit die Diabetes-assoziierte Atheroskleroseentstehung über Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor) Aktivierung (Xie et al. 2016). Der exakt aktivierte Signaltransduktionsweg durch H_2S innerhalb von Endothelzellen wurde jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Die S-Sulfhydrierung ist auch im Hinblick auf die tonusregulierende Eigenschaft von H_2S nicht zu vernachlässigen. Ein möglicher Angriffspunkt der Protein-Persulfidbildung ist die eNOS, wodurch die eNOS Aktivität steigt, vermehrt NO synthetisiert und somit eine Vasodilatation induziert wird (Altaany et al. 2014). Ein weiterer Mechanismus ist die S-Sulfhydrierung des Kationenkanals TRPV4 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 4), sodass es zu einem Ca^{2+} -Einstrom und folglich zur Aktivierung spannungsabhängiger K^+ -Kanäle kommt, was in einer endothelialen Hyperpolarisation und anschließender Vasodilatation resultiert (Naik et al. 2016). Basierend auf diesen molekularen Eigenschaften und dem Effekt auf die Regulation des Blutdruckes kann davon ausgegangen werden, dass H_2S einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines metabolischen Syndroms besitzt. Der Einsatz von H_2S könnte somit die Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt senken, da das metabolische Syndrom eine Erkrankung mit stetig steigender Prävalenz und mit seinen Folgen eine führende Todesursache in den Industrienationen darstellt (Saklayen 2018, Desai et al. 2011).

In der Analyse des ELISAs zeigte sich durch Anwendung von H_2S eine deutliche Reduktion der vWF Sekretion der mit Histamin aktivierten Endothelzellen. Dies könnte ein weiterer Mechanismus sein, über den H_2S seine anti-thrombogenen Eigenschaften entfaltet, welcher in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde.

Neben der Modulation der Ionenkanäle durch S-Sulfhydrierung deuten diese Ergebnisse auf einen Effekt des H_2S auf die Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen hin und bieten damit eine weitere Möglichkeit, um die Endothelzellen in ihrer Funktion zu beeinflussen. Die Exozytose der endothelialen Granula und ihrer Proteine, wie vWF und P-Selektin, gelingt

wesentlich durch die Fusion der WPK mit der Plasmamembran und wird durch den soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE)-Komplex vermittelt. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der WPK Exozytose zugrunde liegen, wird durch die Tatsache verkompliziert, dass Endothelzellen durch eine Reihe von Agonisten aktiviert werden können, welche wiederum zahlreiche nachfolgende Signalwege hervorrufen. Allgemein wird angenommen, dass die Agonisten hauptsächlich über die Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} - und cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel agieren (McCormack et al. 2017). Es ist bereits bekannt, dass H_2S die Exozytose der Granula chromaffiner Zellen (de Pascual et al. 2018), neurosekretorischer Tumorzellen der Hypophyse (Mustafina et al. 2015) und die Mastzelldegranulation (Marino et al. 2016) u.a. über die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen kann. Da auch die Exozytose der WPK von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist, könnte geschlussfolgert werden, dass die Behandlung mit H_2S über die Modulation der Ca^{2+} -Konzentration und der Beeinflussung der Funktionalität des SNARE-Komplexes in einer verminderten Exozytose endothelialer Granula resultiert. Inwiefern die S-Sulphydrierung endothelialer Proteine eine Rolle bei der Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration spielt, ist bislang nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass H_2S in Mastzellen durch Modulation einer Signalkaskade zu einer Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration fähig ist, wodurch die Degranulation inhibiert wird (Marino et al. 2016). In den Endothelzellen wäre ebenfalls eine Modulation von Signalkaskaden denkbar, die zu einer verringerten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt und somit einen weiteren potentiellen Wirkmechanismus darstellt. Auf diese Weise würden, wie in dieser Studie gezeigt, geringere vWF Konzentrationen zur Verfügung stehen und somit die thrombozytäre Adhäsion an subendotheliale Strukturen behindert werden. Außerdem würde es zur verminderten Expression von P-Selektin kommen, was zu einer Reduktion des Rollings der Leukozyten und Thrombozyten auf den Endothelzellen während der primären Hämostase führen würde. Diese möglichen Mechanismen der Endothelzellmodulation stellen einen weiteren erklärenden Ansatz der anti-thrombogenen Eigenschaften von H_2S dar. H_2S verübt diese

anti-thrombogenen Eigenschaften allerdings nicht nur über die Beeinflussung von Endothelzellen, sondern auch durch Modifikation weiterer Zellgruppen des Blutes, wie z.B. Thrombozyten mittels S-Sulphydrierung thrombozytärer Proteine (Zagli et al. 2007, Grambow et al. 2014) und Leukozyten (Zanardo et al. 2006).

Die Angiogenese ist ein Prozess, der hauptsächlich mit Migration, Proliferation und Differenzierung vaskulärer Endothelzellen einhergeht und ist ein häufiges Phänomen bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, einschließlich Organentwicklung, Wundheilung, Tumorentwicklung und Metastasierung (Folkman & Shing 1992). Es wurde belegt, dass H_2S die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen durch NO abhängige und unabhängige Mechanismen fördert (Altaany et al. 2013) und als endogener Stimulator die VEGF induzierte Angiogenese vermittelt (Papapetropoulos et al. 2009). Obwohl zahlreiche Signalmoleküle an der Wirkung von H_2S beteiligt sind, ist die Identifizierung der molekularen Mechanismen und Rezeptoren, dem direkten Ziel von H_2S , eine der herausforderndsten Fragen auf diesem Gebiet. Kürzlich wurde in einem Zell-freien System eine neue S-S-Bindung zwischen Cys1045 und Cys1024 in rekombinantem VEGFR2 identifiziert, dessen Aktivität durch H_2S erhöht wurde (Tao et al. 2013) und somit als möglicher Rezeptor für H_2S dient. Eine S-Sulphydrierung der in VEGFR2 enthaltenen Cys-Reste wurde in der Studie allerdings nicht beobachtet. Die RNA-Interferenz von CSE, welche der gezielten Abschaltung von Genen dient, erzeugte eine fördernde Wirkung der Zellmigration sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie, was darauf hindeutet, dass über CSE gebildetes H_2S eine hemmende Rolle bei der Zellmigration von HUVECs spielt (Tao et al. 2017). In der vorliegenden Studie zeigte sich ebenfalls, dass die Migration der Endothelzellen durch den H_2S Donor GYY deutlich reduziert wird, was für eine Verminderung der endothelialen Aktivität spricht und einen ergänzenden Ansatz für die anti-thrombogene Eigenschaft darstellt. Im Gegensatz dazu wurde durch die Behandlung von HUVECs mit dem herkömmlichen Sulfidsalz NaHS eine signifikant gesteigerte Proliferation von Endothelzellen induziert (Altaany et al. 2013). Diese kontroversen Ergebnisse könnten durch die unterschiedlichen pathophysiologischen Eigenschaften der H_2S Donatoren erklärt

werden, da durch NaHS pro-inflammatorische und durch GYY entzündungshemmende Effekte hervorgerufen werden (Whiteman et al. 2010), die eine unterschiedliche Auswirkung auf die Induktion der Migration, Proliferation und damit die Angiogenese haben könnten.

Die vaskuläre Neointimabildung ist eine häufige Folge von Gefäßläsionen. Um nun die anti-thrombogene Eigenschaft des H₂S Donors GYY und dessen Mechanismen fortführend *in vivo* zu untersuchen, wurde der Einfluss auf die Neointimabildung und die α -SMA und PCNA positiven Zellen im FeCl₃-Thrombose Mausmodell analysiert.

Ein protektiver Effekt von H₂S gegenüber der Atherosklerose Entstehung wurde *in vivo* bereits mithilfe der Ballonverletzung induzierten atherosklerotischen Gefäßläsion im Rattenmodell anhand einer reduzierten Neointimabildung und eines verbesserten Intima-Media-Verhältnisses für den schnellwirksamen H₂S Donor NaHS festgestellt (Meng et al. 2007). Dabei wendeten Meng et al. NaHS vor der Schädigung der Carotis in einer Konzentration von 30 μ M/kg KG an und verabreichten den H₂S Donor intraperitoneal. Dabei wurden H₂S Plasmaspiegel von etwa 70 μ M erzielt. Im Anschluss der Gefäßschädigung erfolgte in der Studie für vier Wochen jeden Tag eine weitere Injektion von H₂S und somit die Aufrechterhaltung der höheren H₂S Plasmaspiegel (Meng et al. 2007).

In einem weiteren Gefäßverletzungsmodell mittels Ligatur wurde gezeigt, dass der H₂S Donor NaHS neben der Neointimabildung auch die Migration der glatten Muskelzellen abschwächt (Yang et al. 2012). In dieser Studie wurde NaHS ebenfalls an 28 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal injiziert, jedoch mit einer Konzentration von 60 μ M/kg KG, sodass hier von deutlich erhöhten H₂S Plasmaspiegeln ausgegangen werden kann (Yang et al. 2012).

Als Reaktion auf Gefäßverletzungen wandern glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) von der Media in die Intima, wo sie an der Bildung der Neointima teilnehmen (Pauly et al. 1994). Der Prozess der SMC Migration wird durch eine Reihe von Signalen geregelt und könnte auch im FeCl₃-Thrombosemodell eine pathophysiologische Rolle spielen. Führende Signale umfassen die Wechselwirkung von Integrinen mit der umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) sowie eine veränderte Expression von Matrix-abbauenden Proteasen (Bendeck

et al. 1994). Die EZM beeinflusst die Funktionalität der SMCs, wie z.B. deren Adhäsion und Ausbreitung (Dollery et al. 1995). Integrine stellen die Verbindung zwischen der EZM und dem intrazellulären Signalapparat dar (Murillo et al. 2009). Matrix-Metalloproteasen (MMPs) gehören zu einer Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die alle EZM Komponenten abbauen können und somit die Migration von SMCs erleichtern (Galis & Khatri 2002). Die Produktion der MMPs wird durch Rückmeldung der EZM durch Signalisierung des Integrinrezeptors reguliert (Bendeck et al. 2000, Abraham et al. 2008).

Über die Interaktionen zwischen H_2S , Integrinen und MMPs wurde bereits in zahlreichen Studien berichtet. So schützte H_2S das Herz vor oxidativem Stress und nachteiligem Remodelling bei chronischer Herzinsuffizienz, indem es die Expression von MMPs reduzierte (Calvert et al. 2010) und beeinträchtigte die Zelladhäsion von Keratinozyten durch Herunterregulierung der β_4 -, α_2 - und α_6 -Integrine (Gobbi et al. 2009). Die Auswirkungen von H_2S auf Integrine und MMPs hinsichtlich der SMC Migration sind jedoch nicht gut charakterisiert und könnten neben dem Einfluss von H_2S auf die Endothelzellaktivität einen weiteren pathophysiologischen Ansatz der Gefäßprotektion darstellen. Qin et al. zeigten bereits im Rattenmodell eine Reduktion der durch $FeCl_3$ induzierten arteriellen Thrombose durch Anwendung von H_2S (Qin et al. 2016). Allerdings wurde auch in dieser Studie NaHS als H_2S Donor verwendet. Des Weiteren erfolgte eine NaHS Vorbehandlung an drei aufeinander folgenden Tagen und erst im Anschluss die Schädigung der A. carotis mittels $FeCl_3$. Dabei wurde NaHS in einer Konzentration von 0,056, 0,56, 2,8 oder 5,6 mg/kg KG verwendet und 24 Stunden nach der Gefäßverletzung das Gewicht des herausgelösten Thrombus gemessen. Es zeigte sich, dass die Thrombusformationen in den Ratten, die mit einer Konzentration von 0,56 mg/kg KG NaHS vorbehandelt wurden, das geringste Gewicht aufwiesen. Durch diese Konzentration wurden H_2S Plasmaspiegel von etwa 48 μM erreicht. Eine Reduktion der α -SMA Expression konnte durch die Anwendung von NaHS jedoch nicht erzielt werden (Qin et al. 2016).

Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit ließen eine signifikante Reduktion des Durchmessers, der Fläche sowie der α -SMA und PCNA positiven Zellen der arteriellen Neointimabildung der A. carotis communis durch die Behandlung mit GYY verzeichnen. So kann postuliert werden, dass der kontinuierlich und in physiologischen Konzentrationen liberierende H_2S Donor einen protektiven Effekt auf die Neointimabildung und somit auf die Entstehung einer arteriellen Thrombose besitzt. Im Vergleich zu dem salzförmigen H_2S Donor NaHS besitzt GYY zudem den Vorteil, dass die einmalige intravenöse Applikation ausreicht, um die protektiven Eigenschaften auf das Gefäßsystem zu entfalten. Zudem kann die Reduktion der α -SMA und PCNA positiven Zellen als Ausdruck einer Reduktion der Zellaktivität von SMCs und Fibroblasten gewertet werden und legt einen möglichen Mechanismus von H_2S dar.

9 Schlussfolgerung

H₂S spielt als pleiotroper Mediator in vielen physiologischen als auch pathologischen Aktivitäten eine wesentliche Rolle, beeinflusst zahlreiche Organsysteme, und könnte somit auf verschiedensten Gebieten als Therapeutikum eingesetzt werden (Wu et al. 2016).

Aufgrund der limitierten Daten über die physiologischen Konzentrationen von H₂S im menschlichen Organismus ist die klinische Anwendung von H₂S freisetzenden Substanzen jedoch noch als kritisch zu werten und bedarf weiterer experimenteller Studien. Die in der Literatur angegebenen Konzentrationen reichen dabei von Werten im Bereich von nanomolar bis mikromolar (Furne et al. 2008, Whiteman & Moore 2009, Hughes et al. 2009). Jedoch werden die geringeren Konzentrationen eher als physiologisch betrachtet. Die Detektion unterschiedlicher Speicherformen von H₂S durch verschiedene Messmethoden liefern eine Erklärung für die divergierenden Angaben der Konzentration (Vandiver & Snyder 2012). Um den sicheren Einsatz von H₂S zu ermöglichen, müssen demnach neue Methoden mit niedrigen Nachweisgrenzen entwickelt werden, um die eindeutige Messung von H₂S Konzentrationen in verschiedenen Geweben und Erkrankungen zu gewährleisten sowie um bedrohliche Nebenwirkungen zu vermeiden. Unerwünschte Reaktionen beruhen dabei vornehmlich auf der Bindung von H₂S an die Cytochrom-C-Oxidase und der damit einhergehenden Hemmung der mitochondrialen Atmungskette (Lloyd 2006, Hughes et al. 2009). Potentielle Nebenwirkungen und auch vielfältige Interaktionen resultieren zusätzlich aus dem pleiotropen Charakter von H₂S und der Beeinflussung zahlreicher Organsysteme. GYY wäre in diesem Zusammenhang aufgrund der kontinuierlichen Freisetzung geringerer H₂S Konzentrationen, gegenüber anderen H₂S liberierenden Substanzen, hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils im Vorteil.

Auch die eindeutigen Wirkmechanismen von H₂S sind noch immer kontrovers diskutiert, sodass die Mechanismen der Zellsignalisierung, welche die vielseitigen protektiven Effekte vermitteln, weiterhin in einer Vielzahl von Krankheitszuständen in einer Reihe von Studien untersucht werden müssen. Darüber hinaus ist es von äußerster Wichtigkeit, ein Verständnis des Mechanismus der H₂S Freisetzung, der Modulation der Synthese und des Abbaus zu

erlangen, um einen Weg in der klinisch therapeutischen Anwendung für zukünftige Vorteile der Verwendung von H_2S zu bieten. Auch in diesem Hinblick kann davon ausgegangen werden, dass GYY den anderen H_2S Donatoren aufgrund der besseren Steuerungsfähigkeit überlegen wäre.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieser Studie nahe, dass GYY, als langsam und kontinuierlich liberierender H_2S Donor, durch seine anti-thrombogenen und anti-atherogenen Effekte ein potentielles Target in der medikamentösen Prophylaxe und Therapie von venösen und arteriellen Thrombosen sowie der Atherosklerose sein könnte.

10 Literaturverzeichnis

Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. **E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow.** J Clin Invest. 1993;92:2719-30.

Abegunde DO, Mathers CD, Adam T, Ortegon M, Strong K. **The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries.** Lancet. 2007;370:1929-38.

Abe K, Kimura H. **The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator.** J Neurosci. 1996;16:1066-71.

Abraham S, Kogata N, Fässler R, Adams RH. **Integrin beta1 subunit controls mural cell adhesion, spreading, and blood vessel wall stability.** Circ Res. 2008;102:562-70.

Allavena R, Noy S, Andrews M, Pullen N. **CNS elevation of vascular and not mucosal addressin cell adhesion molecules in patients with multiple sclerosis.** Am J Pathol. 2010;176:556-62.

Altaany Z, Ju Y, Yang G, Wang R. **The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide.** Sci Signal. 2014;7:ra87.

Altaany Z, Yang G, Wang R. **Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells.** J Cell Mol Med 2013;17:879–888.

Arfors KE, Dhall DP, Engeset J, Hint H, Matheson NA, Tangen O. **In vivo quantitation of platelet activity using biolaser-induced endothelial injury.** Bibl Anat. 1969;10:502-6.

Barr JD, Chauhan AK, Schaeffer GV, Hansen JK, Motto DG. **Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model.** Blood. 2013;121:3733-41.

Baskar R, Li L, Moore PK. **Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells.** FASEB J. 2007;21:247-55.

Bearden SE, Beard RS Jr, Pfau JC. **Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;299:H1568-76.

Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, Smith L, Mulholland D, Horton M, Giachelli CM. **Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:1467-72.

Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. **Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat.** Circ Res. 1994;75:539-45.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. **Antidepressant effects of ketamine in depressed patients.** Biol Psychiatry. 2000;47:351-4.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.** Biotechnol Annu Rev. 2005;11:127-52.

Bibli SI, Hu J, Sigala F, Wittig I, Heidler J, Zukunft S, Tsilimigras DI, Randriamboavonjy V, Wittig J, Kojonazarov B, Schürmann C, Siragusa M, Siuda D, Luck B, Abdel Malik R, Filis

- KA, Zografos G, Chen C, Wang DW, Pfeilschifter J, Brandes RP, Szabo C, Papapetropoulos A, Fleming I. **Cystathionine γ Lyase Sulfhydrates the RNA Binding Protein Human Antigen R to Preserve Endothelial Cell Function and Delay Atherogenesis.** *Circulation*. 2019;139:101-114.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. **Adhesion molecules and atherosclerosis.** *Atherosclerosis*. 2003;170:191-203.
- Bloemen PG, van den Tweel MC, Henricks PA, Engels F, Wagenaar SS, Rutten AA, Nijkamp FP. **Expression and modulation of adhesion molecules on human bronchial epithelial cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9:586-93.
- Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. **PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.** *Blood*. 1989;73:1109-12.
- Borges E, Tietz W, Steegmaier M, Moll T, Hallmann R, Hamann A, Vestweber D. **P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin.** *J Exp Med*. 1997;185:573-8.
- Bosse R, Vestweber D. **Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum.** *Eur J Immunol*. 1994;24:3019-24.
- Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG. **Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice.** *Genes Brain Behav*. 2004;3:149-57.
- Breslow JL. **Mouse models of atherosclerosis.** *Science*. 1996;272:685-8.
- Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, McRoberts JA. **Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies.** *J Neurogenet*. 2008;22:315-31.
- Cai WJ, Wang MJ, Moore PK, Jin HM, Yao T, Zhu YC. **The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation.** *Cardiovasc Res*. 2007;76:29-40.
- Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, Gundewar S, Jha S, Elrod JW, Ramachandran A, Lefer DJ. **Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice.** *Circulation*. 2010;122:11-9.
- Ceolotto G, De Kreutzenberg SV, Cattelan A, Fabricio AS, Squarcina E, Gion M, Semplicini A, Fadini GP, Avogaro A. **Sirtuin 1 stabilization by HuR represses TNF- α - and glucose-induced E-selectin release and endothelial cell adhesiveness in vitro: relevance to human metabolic syndrome.** *Clin Sci (Lond)*. 2014;127:449-61.
- Chan CH, Pieper IL, Fleming S, Friedmann Y, Foster G, Hawkins K, Thornton CA, Kanamarlapudi V. **The effect of shear stress on the size, structure, and function of human von Willebrand factor.** *Artif Organs*. 2014;38:741-50.
- Chang R, Powell RJ, Sumpio BE. **Tissue plasminogen activator-biologic perspective for surgeons.** *J Am Coll Surg*. 1997;184:529-39.
- Chen X, Jhee KH, Kruger WD. **Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine.** *J Biol Chem*. 2004;279:52082-6.

Chia MC. **The role of adhesion molecules in atherosclerosis.** Crit Rev Clin Lab Sci. 1998;35:573-602.

Ciciliano JC, Sakurai Y, Myers DR, Fay ME, Hechler B, Meeks S, Li R, Dixon JB, Lyon LA, Gachet C, Lam WA. **Resolving the multifaceted mechanisms of the ferric chloride thrombosis model using an interdisciplinary microfluidic approach.** Blood. 2015;126:817-24.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. **Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.** Blood. 1998;91:3527-61.

Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone MA Jr, Cremona O, Marchisio PC, Dejana E. **Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane.** Blood. 1992;80:437-46.

Cooke JP. **The endothelium: a new target for therapy.** Vasc Med. 2000;5:49-53.

Cotran RS, Pober JS. **Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury.** J Am Soc Nephrol. 1990;1:225-35.

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. **A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.** J Clin Invest. 2001;107:1255-62.

Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, Renné T, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. **Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation.** Blood. 2012;120:2133-43.

Davies SN, Alford ST, Coan EJ, Lester RA, Collingridge GL. **Ketamine blocks an NMDA receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus in a voltage-dependent manner.** Neurosci Lett 1988; 92:213–217.

Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP. **Murine thrombosis models.** Thromb Haemost. 2004;92:486-94.

De Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. **Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1.** J Exp Med. 1991;174:253-67.

Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Culleré M, Hynes RO, Wagner DD. **A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9524-9.

De Pascual R, Baraibar AM, Méndez-López I, Pérez-Ciria M, Polo-Vaquero I, Gandía L, Ohia SE, García AG, de Diego AMG. **Hydrogen sulphide facilitates exocytosis by regulating the handling of intracellular calcium by chromaffin cells.** Pflugers Arch. 2018;470:1255-1270.

Desai KM, Chang T, Untereiner A, Wu L. **Hydrogen sulfide and the metabolic syndrome.** Expert Rev Clin Pharmacol. 2011;4:63-73.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, Roviezzo F, Morelli A, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. **Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels.** J Pharmacol Exp Ther. 2006;316:325-35.

- Dittmar MS, Fehm NP, Vatankhah B, Horn M. **Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications.** Comp Med. 2004;54:652-5.
- Domino EF, Chodoff P, Corssen G. **Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man.** Clin Pharmacol Ther 1965;6:279-291.
- Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. **Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease.** Circ Res. 1995;77:863-8.
- Dong JF. **Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions.** J Thromb Haemost. 2005;3:1710-6.
- Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. **Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model.** J Clin Invest. 2007;117:953-60.
- Ebnet K, Vestweber D. **Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines.** Histochem Cell Biol. 1999;112:1-23.
- Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, Mangin PH, Gachet C. **Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis.** J Thromb Haemost. 2011;9:779-89.
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. **VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site.** Cell. 1990;60:577-84.
- Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ. **Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:15560-5.
- Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, Kimura H. **Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS.** FASEB J. 2005;19:1854-6.
- Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP. **Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice.** Circulation. 1998;97:1002-8.
- Fearon IM, Faux SP. **Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight.** J Mol Cell Cardiol. 2009;47:372-81.
- Folkman J, Shing Y. **Angiogenesis.** J Biol Chem. 1992;267:10931-4.
- Frank PG, Lisanti MP. **ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;295:H926-H927.
- Fukuto JM, Carrington SJ, Tantillo DJ, Harrison JG, Ignarro LJ, Freeman BA, Chen A, Wink DA. **Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species.** Chem Res Toxicol. 2012;25:769-93.

Furne J, Saeed A, Levitt MD. **Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295:R1479-85.

Galis ZI, Khatri JJ. **Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.** Circ Res. 2002;90:251-62.

Galkina E, Ley K. **Vascular adhesion molecules in atherosclerosis.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:2292-301.

García-Bereguiaín MA, Samhan-Arias AK, Martín-Romero FJ, Gutiérrez-Merino C. **Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca²⁺ channels.** Antioxid Redox Signal. 2008;10:31-42.

Gobbi G, Ricci F, Malinverno C, Carubbi C, Pambianco M, Panfilis Gd, Vitale M, Mirandola P. **Hydrogen sulfide impairs keratinocyte cell growth and adhesion inhibiting mitogen-activated protein kinase signaling.** Lab Invest. 2009;89:994-1006.

Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warencya MW, Reiffenstein RJ, Dowling G. **Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports.** J Anal Toxicol. 1989;13:105-9.

Grambow E, Leppin C, Leppin K, Kundt G, Klar E, Frank M, Vollmar B. **The effects of hydrogen sulfide on platelet-leukocyte aggregation and microvascular thrombolysis.** Platelets. 2016;7:1-9.

Grambow E, Mueller-Graf F, Delyagina E, Frank M, Kuhla A, Vollmar B. **Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice.** Platelets. 2014;25:166-74.

Greene SA, Thurmon JC. Xylazine--a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. J Vet Pharmacol Ther. 1988;11:295-313.

Guidotti TL. **Hydrogen sulfide: advances in understanding human toxicity.** Int J Toxicol. 2010;29:569-81.

Han Y, Qin J, Chang X, Yang Z, Bu D, Du J. **Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats.** Neurosci Res. 2005;53:216-9.

Herold G. **Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs für die Ärztliche Prüfung.** 2017

Hirata T, Furie BC, Furie B. **P-, E-, and L-selectin mediate migration of activated CD8⁺ T lymphocytes into inflamed skin.** J Immunol. 2002;169:4307-13.

Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. **The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation.** Science. 2002;298:1241-5.

Hogg PJ. **Contribution of allosteric disulfide bonds to regulation of hemostasis.** J Thromb Haemost. 2009;7 Suppl 1:13-6.

Hoofnagle MH, Thomas JA, Wamhoff BR, Owens GK. **Origin of neointimal smooth muscle: we've come full circle.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:2579-81.

Horwitz AF. **Integrins and health.** Sci Am. 1997;276:68-75.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. **The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide.** Biochem Biophys Res Commun. 1997; 237:527-31.

Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS. **Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models.** Aging Cell. 2010;9:135-46.

Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. **Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia.** J Neurochem. 2007;100:1121-8.

Hughes MN, Centelles MN, Moore KP. **Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review.** Free Radic Biol Med. 2009;47:1346-53.

Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. **A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain.** Antioxid Redox Signal. 2009;11:205-14.

Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. **Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression.** Biochem J. 2004 1;381:113-23.

Jacob SW, Bischel M, Herschler RJ. **Dimethyl sulfoxide (DMSO): A new concept in Pharmacotherapy.** Curr Ther Res Clin Exp. 1964;6:134-5.

Jacob SW, Herschler R. **Pharmacology of DMSO.** Cryobiology. 1986;23:14-27.

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH. **Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.** Nat Cell Biol. 2001;3:193-7.

Jaffrey SR, Snyder SH. **The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins.** Sci STKE. 2001;2001:pl1.

Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. **In vitro cell migration and invasion assays.** J Vis Exp. 2014;(88).

Kabil O, Banerjee R. **Redox biochemistry of hydrogen sulfide.** J Biol Chem. 2010;285:21903–21907.

Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. **CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils.** J Exp Med. 2005;201:1183-9.

Kimura H. **Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators.** Molecules 2014;19:16146–16157.

Kimura H. **Physiological Roles of Hydrogen Sulfide and Polysulfides.** Handb Exp Pharmacol 2015;230:61–81.

- Kimura Y, Kimura H. **Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress.** FASEB J. 2004;18:1165-7.
- King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, Otsuka H, Kondo K, Nicholson CK, Bradley JM, Islam KN, Calvert JW, Tao YX, Dugas TR, Kelley EE, Elrod JW, Huang PL, Wang R, Lefer DJ. **Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:3182-7.
- Konstantinides S, Schäfer K, Thinnies T, Loskutoff DJ. **Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice.** Circulation. 2001;103:576-83.
- Kram L, Grambow E, Mueller-Graf F, Sorg H, Vollmar B. **The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases.** Thromb Res. 2013;132:e112-7.
- Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, Tonks NK. **H₂S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response.** Sci Signal. 2011;4:ra86.
- Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. **Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride.** Thromb Res. 1990;60:269-80.
- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. **PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes.** Cell. 1989;59:305-12.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. **Cell migration: a physically integrated molecular process.** Cell. 1996;84:359-69.
- Lawrence MB, Springer TA. **Neutrophils roll on E-selectin.** J Immunol. 1993;151:6338-46.
- Leadley RJ Jr, Morgan SR, Bentley R, Bostwick JS, Kasiewski CJ, Heran C, Chu V, Brown K, Moxey P, Ewing WR, Pauls H, Spada AP, Perrone MH, Dunwiddie CT. **Pharmacodynamic activity and antithrombotic efficacy of RPR120844, a novel inhibitor of coagulation factor Xa.** J Cardiovasc Pharmacol. 1999;34:791-9.
- Ledebur HC, Parks TP. **Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers.** J Biol Chem. 1995;270:933-43.
- Lee SW, Hu YS, Hu LF, Lu Q, Dawe GS, Moore PK, Wong PT, Bian JS. **Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells.** Glia. 2006;54:116-24.
- Le Fur N, Kelsall SR, Mintz B. **Base substitution at different alternative splice donor sites of the tyrosinase gene in murine albinism.** Genomics. 1996 Oct;37:245-8.
- Ley K, Huo Y. **VCAM-1 is critical in atherosclerosis.** J Clin Invest. 2001;107:1209-10.
- Libby P. **Inflammation in atherosclerosis.** Nature. 2002 Dec;420:868-74.
- Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK. **Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule**

(GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation. 2008;117:2351-60.

Li W, McIntyre TM1, Silverstein RL. **Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology.** Redox Biol. 2013;1:50-5.

Lin S, Visram F, Liu W, Haig A, Jiang J, Mok A, Lian D, Wood ME, Torregrossa R, Whiteman M, Lobb I, Sener A. **GYY4137, a Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, Ameliorates Renal Damage Associated with Chronic Obstructive Uropathy.** J Urol. 2016;196:1778-1787.

Lin X, Yu S, Chen Y, Wu J, Zhao J, Zhao Y. **Neuroprotective effects of diallyl sulfide against transient focal cerebral ischemia via anti-apoptosis in rats.** Neurol Res. 2012;34:32-7.

Lloyd D. **Hydrogen sulfide: clandestine microbial messenger?** Trends Microbiol. 2006;14:456-62.

Lu M, Choo CH, Hu LF, Tan BH, Hu G, Bian JS. **Hydrogen sulfide regulates intracellular pH in rat primary cultured glia cells.** Neurosci Res. 2010;66:92-8.

Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. **Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake.** Free Radic Biol Med. 2008;45:1705-13.

Lüllmann-Rauch R. **Histologie.** 4. vollständig überarbeitete Auflage. 2012. Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart · New York.

Luscinskas FW, Lawler J. **Integrins as dynamic regulators of vascular function.** FASEB J. 1994;8:929-38.

Mani S, Li H, Untereiner A, Wu L, Yang G, Austin RC, Dickhout JG, Lhoták Š, Meng QH, Wang R. **Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis.** Circulation. 2013 Jun;127:2523-34.

Marino A, Martelli A, Citi V, Fu M, Wang R, Calderone V, Levi R. **The novel H₂ S donor 4-carboxy-phenyl isothiocyanate inhibits mast cell degranulation and renin release by decreasing intracellular calcium.** Br J Pharmacol. 2016;173:3222-3234.

Marsh Lyle E, Lewis SD, Lehman ED, Gardell SJ, Motzel SL, Lynch JJ Jr. **Assessment of thrombin inhibitor efficacy in a novel rabbit model of simultaneous arterial and venous thrombosis.** Thromb Haemost. 1998;79:656-62.

McCormack JJ, Lopes da Silva M, Ferraro F, Patella F, Cutler DF. **Weibel-Palade bodies at a glance.** J Cell Sci. 2017;130:3611-3617.

McEver RP. **Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow.** Curr Opin Cell Biol. 2002;14:581-6.

McEver RP, Moore KL, Cummings RD. **Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions.** J Biol Chem. 1995;270:11025-8.

Meng G, Wang J, Xiao Y, Bai W, Xie L, Shan L, Moore PK, Ji Y. **GGY4137 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating oxidative stress and apoptosis in rats.** J Biomed Res. 2015;29:203-13.

Meng G, Zhu J, Xiao Y, Huang Z, Zhang Y, Tang X, Xie L, Chen Y, Shao Y, Ferro A, Wang R, Moore PK, Ji Y. **Hydrogen Sulfide Donor GGY4137 Protects against Myocardial Fibrosis.** Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:691070.

Meng QH, Yang G, Yang W, Jiang B, Wu L, Wang R. **Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury-induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries.** Am J Pathol. 2007;170:1406-14.

Metzler B, Mair J, Lercher A, Schaber C, Hintringer F, Pachinger O, Xu Q. **Mouse model of myocardial remodelling after ischemia: role of intercellular adhesion molecule-1.** Cardiovasc Res. 2001;49:399-407.

Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H. **Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ -lyase at the steady-state low intracellular Ca^{2+} concentrations.** Biochem Biophys Res Commun. 2013;431:131-5.

Mion G, Villeveille T. **Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings).** CNS Neurosci Ther. 2013;19:370-80.

Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. **Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells.** J Cell Biol. 1992;118:445-56.

Morel A, Malinowska J, Olas B. **Antioxidative properties of hydrogen sulfide may involve in its antiadhesive action on blood platelets.** Clin Biochem. 2012;45:1678-82.

Morel A, Malinowska J, Olas B. **Hydrogen sulfide changes adhesive properties of fibrinogen and collagen in vitro. Platelets.** 2014;25:147-9.

Morrison LD, Smith DD, Kish SJ. **Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease.** J Neurochem. 1996;67:1328-31.

Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. **Homocystinuria: An Enzymatic Defect.** Science. 1964;143:1443-5.

Mudd SH, Levy HL. **Disorders of transsulfuration, in The Metabolic Basis of Inherited Disease**, edited by Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, New York, McGraw-Hill, 1978, pp 458-503.

Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, et al. **The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency.** Am J Hum Genet. 1985;37:1-31.

Murillo CA, Woodside KJ, Guo Q, Zhang S, O'Connor KL, Hunter GC. **Integrin and matrix metalloproteinase expression in human carotid plaque.** J Surg Res. 2009;155:157-64.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. **H₂S signals through protein S-sulphydration.** Sci Signal. 2009;2:ra72.

- Mustafina AN, Yakovlev AV, Gaifullina ASh, Weiger TM, Hermann A, Sitdikova GF. **Hydrogen sulfide induces hyperpolarization and decreases the exocytosis of secretory granules of rat GH3 pituitary tumor cells.** Biochem Biophys Res Commun. 2015;465:825-31.
- Myers D Jr, Farris D, Hawley A, Wroblewski S, Chapman A, Stoolman L, Knibbs R, Strieter R, Wakefield T. **Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis.** J Surg Res. 2002;108:212-21.
- Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T. **Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis.** Histochem Cell Biol 1998;110:243–250.
- Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. **Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes.** FASEB J. 2004;18:557-9.
- Naik JS, Osmond JM, Walker BR, Kanagy NL. **Hydrogen sulfide-induced vasodilation mediated by endothelial TRPV4 channels.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016;311:H1437-H1444.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. **ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.** Arterioscler Thromb. 1994;14:133-40.
- Niu WN, Yadav PK, Adamec J, Banerjee R. **S-glutathionylation enhances human cystathionine β -synthase activity under oxidative stress conditions.** Antioxid Redox Signal. 2015;22:350-61.
- Njie-Mbye YF, Bongmba OY, Onyema CC, Chitnis A, Kulkarni M, Opere CA, LeDay AM, Ohia SE. **Effect of hydrogen sulfide on cyclic AMP production in isolated bovine and porcine neural retinae.** Neurochem Res. 2010;35:487-94.
- Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A. **Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides.** J Biol Chem. 1993;268:12764-74.
- Obi AT, Andraska E, Kanthi Y, Kessinger CW, Elflin M, Luke C, Siahaan TJ, Jaffer FA, Wakefield TW, Henke PK. **Endotoxaemia-augmented murine venous thrombosis is dependent on TLR-4 and ICAM-1, and potentiated by neutropenia.** Thromb Haemost. 2017;117:339-348.
- Olas B, Kontek B. **The possible role of hydrogen sulfide as a modulator of hemostatic parameters of plasma.** Chem Biol Interact. 2014;220:20-4.
- Olson KR. **The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011;301:R297-312.
- Otto VI, Damoc E, Cueni LN, Schürpf T, Frei R, Ali S, Callewaert N, Moise A, Leary JA, Folkers G, Przybylski M. **N-glycan structures and N-glycosylation sites of mouse**

soluble intercellular adhesion molecule-1 revealed by MALDI-TOF and FTICR mass spectrometry. *Glycobiology*. 2006;16:1033-44.

Pan LL, Liu XH, Gong QH, Wu D, Zhu YZ. **Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- α -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells.** *PLoS One*. 2011;6:e19766.

Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabó C. **Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:21972-7.

Paul BD, Snyder SH. **Protein sulfhydration.** *Methods Enzymol*. 2015;555:79-90.

Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, et al. **Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation.** *Circ Res*. 1994;75:41-54.

Pearson JD. **Endothelial cell function and thrombosis.** *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999;12:329-41.

Pober JS, Sessa WC. **Evolving functions of endothelial cells in inflammation.** *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803-15.

Polhemus DJ, Kondo K, Bhushan S, Bir SC, Kevil CG, Murohara T, Lefer DJ, Calvert JW. **Hydrogen sulfide attenuates cardiac dysfunction after heart failure via induction of angiogenesis.** *Circ Heart Fail*. 2013;6:1077-86.

Polhemus DJ, Lefer DJ. **Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease.** *Circ Res*. 2014;114:730-7.

Predmore BL, Lefer DJ, Gojon G. **Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine.** *Antioxid Redox Signal*. 2012;17:119–140.

Qin YR, You SJ, Zhang Y, Li Q, Wang XH, Wang F, Hu LF, Liu CF. **Hydrogen sulfide attenuates ferric chloride-induced arterial thrombosis in rats.** *Free Radic Res*. 2016;50:654-65.

Quarmby J, Smith A, Collins M, Cederholm-Williams S, Burnand K. **A model of in vivo human venous thrombosis that confirms changes in the release of specific soluble cell adhesion molecules in experimental venous thrombogenesis.** *J Vasc Surg*. 1999;30:139-47.

Rabinovich A, Cohen JM, Cushman M, Wells PS, Rodger MA, Kovacs MJ, Anderson DR, Tagalakis V, Lazo-Langner A, Solymoss S, Miron MJ, Yeo E, Smith R, Schulman S, Kassir J, Kearon C, Chagnon I, Wong T, Demers C, Hanmiah R, Kaatz S, Selby R, Rathbun S, Desmarais S, Opatrny L, Ortel TL, Ginsberg JS, Kahn SR. **Inflammation markers and their trajectories after deep vein thrombosis in relation to risk of post-thrombotic syndrome.** *J Thromb Haemost*. 2015;13:398-408.

Reimann-Hunziker G. **Über experimentelle Thrombose und ihre Behandlung mit Heparin.** *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 1944;74:66–69.

- Rice GE, Munro JM, Corless C, Bevilacqua MP. **Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues.** Am J Pathol. 1991;138:385-93.
- Roebuck KA, Finnegan A. **Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression.** J Leukoc Biol. 1999;66:876-88.
- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, López JA. **The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin.** J Exp Med. 1999;190:803-14.
- Rosen ED, Raymond S, Zollman A, Noria F, Sandoval-Cooper M, Shulman A, Merz JL, Castellino FJ. **Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi.** Am J Pathol. 2001;158:1613-22.
- Rose P, Dymock BW, Moore PK. **GY4137, a novel water-soluble, H₂S-releasing molecule.** Methods Enzymol. 2015;554:143-67.
- Sadler JE, Budde U, Eikenboom JC, Favaloro EJ, Hill FG, Holmberg L, Ingerslev J, Lee CA, Lillicrap D, Mannucci PM, Mazurier C, Meyer D, Nichols WL, Nishino M, Peake IR, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Ruggeri ZM, Srivastava A, Montgomery RR, Federici AB; Working Party on von Willebrand Disease Classification. **Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor.** J Thromb Haemost. 2006;4:2103-14.
- Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA. **Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models.** Exp Biol Med (Maywood). 2005;230:777-84.
- Saklayen MG. **The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome.** Curr Hypertens Rep. 2018;20:12.
- Sanz J, Moreno PR, Fuster V. **The year in atherothrombosis.** J Am Coll Cardiol. 2012;60:932-42.
- Sasaki T, Kuzuya M, Cheng XW, Nakamura K, Tamaya-Mori N, Maeda K, Kanda S, Koike T, Sato K, Iguchi A. **A novel model of occlusive thrombus formation in mice.** Lab Invest. 2004;84:1526-32.
- Scherbel AL, McCormack LJ, Poppo MJ. **Alteration of Collagen in Generalized Scleroderma (Progressive Systemic Sclerosis) After Treatment With Dimethyl Sulfoxide: Preliminary Report.** Cleve Clin Q. 1965;32:47-56.
- Seligsohn U, Lubetsky A. **Genetic susceptibility to venous thrombosis.** N Engl J Med. 2001;344:1222-31.
- Sha L, Linden DR, Farrugia G, Szurszewski JH. **Effect of endogenous hydrogen sulfide on the transwall gradient of the mouse colon circular smooth muscle.** J Physiol. 2014;592:1077-89.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. **Integrin signaling: the platelet paradigm.** Blood. 1998;91:2645-57.

Shbaklo H, Holcroft CA, Kahn SR. **Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome.** Thromb Haemost. 2009;101:505-12.

Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H. **A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells.** Nat Commun. 2013;4:1366.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. **Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide.** J Biochem. 2009;146:623-6.

Silbernagl S, Klinke R, Pape HS, Kurtz A. **Physiologie.** 6. vollständig überarbeitete Auflage 2010. Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart · New York.

Singh R, Pan S, Mueske CS, Witt TA, Kleppe LS, Peterson TE, Caplice NM, Simari RD. **Tissue factor pathway inhibitor deficiency enhances neointimal proliferation and formation in a murine model of vascular remodelling.** Thromb Haemost. 2003;89:747-51.

Smith A, Quarmby JW, Collins M, Lockhart SM, Burnand KG. **Changes in the levels of soluble adhesion molecules and coagulation factors in patients with deep vein thrombosis.** Thromb Haemost. 1999;82:1593-9.

Smith RP, Gosselin RE. **Hydrogen sulfide poisoning.** J Occup Med. 1979;21:93-7.

Stanley AC, Dalton JE, Rossotti SH, MacDonald KP, Zhou Y, Rivera F, Schroder WA, Maroof A, Hill GR, Kaye PM, Engwerda CR. **VCAM-1 and VLA-4 modulate dendritic cell IL-12p40 production in experimental visceral leishmaniasis.** PLoS Pathog. 2008;4:e1000158.

Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. **A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation.** J Cell Biol. 1985;101:880-6.

Stipanuk MH, Beck PW. **Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphydration in liver and kidney of the rat.** Biochem J. 1982;206:267-77.

Sullivan VV, Hawley AE, Farris DM, Knipp BS, Varga AJ, Wroblewski SK, Thanaporn P, Eagleton MJ, Myers DD, Fowlkes JB, Wakefield TW. **Decrease in fibrin content of venous thrombi in selectin-deficient mice.** J Surg Res. 2003;109:1-7.

Szabó C, Papapetropoulos A. **Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications.** Br J Pharmacol. 2011;164:853-65.

Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. **Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells.** Mol Pharmacol. 2005;68:1757-64.

Tao BB, Liu SY, Zhang CC, Fu W, Cai WJ, Wang Y, Shen Q, Wang MJ, Chen Y, Zhang LJ, Zhu YZ, Zhu YC. **VEGFR2 functions as an H₂S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045-Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells.** Antioxid Redox Signal. 2013;19:448-64.

- Tao B, Wang R, Sun C, Zhu Y. **3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase, Not Cystathionine β -Synthase Nor Cystathionine γ -Lyase, Mediates Hypoxia-Induced Migration of Vascular Endothelial Cells.** Front Pharmacol. 2017;8:657.
- Taoka S, Banerjee R. **Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme.** J Inorg Biochem. 2001;87:245-51.
- Tseng MT, Dozier A, Haribabu B, Graham UM. **Transendothelial migration of ferric ion in FeCl₃ injured murine common carotid artery.** Thromb Res. 2006;118:275-80.
- Turner N, Nolasco L, Dong JF, Moake J. **ADAMTS-13 cleaves long von Willebrand factor multimeric strings anchored to endothelial cells in the absence of flow, platelets or conformation-altering chemicals.** J Thromb Haemost. 2009;7:229-32.
- Ubuka T, Umemura S, Yuasa S, Kinuta M, Watanabe K. **Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver.** Physiol Chem Phys 1978;10:483–500.
- Van Buul JD, Hordijk PL. **Signaling in leukocyte transendothelial migration.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:824-33.
- Van den Born JC, Mencke R, Conroy S, Zeebregts CJ, van Goor H, Hillebrands JL. **Cystathionine γ -lyase is expressed in human atherosclerotic plaque microvessels and is involved in micro-angiogenesis.** Sci Rep. 2016;6:34608.
- Van Hinsbergh VW. **Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation.** Semin Immunopathol. 2012;34:93-106.
- Van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. **Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies.** Histochem Cell Biol. 2002;117:113-22.
- Vandiver M, Snyder SH. **Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance.** J Mol Med (Berl). 2012;90:255-63.
- Varki A. **Selectin ligands.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:7390-7.
- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. **New fundamentals in hemostasis.** Physiol Rev. 2013 Jan;93:327-58.
- Vestweber D, Blanks JE. **Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands.** Physiol Rev. 1999;79:181-213.
- Vilahur G, Padro T, Badimon L. **Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models.** J Biomed Biotechnol. 2011;2011:907575.
- Virchow R (1856). **Thrombose und Embolie. Gefäßentzündungen und septische Infektion.** 1. Auflage, Olms, Georg, Hildesheim 2008; Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin.
- Wagner DD, Marder VJ. **Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization.** J Cell Biol. 1984;99:2123-30.

- Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. **Mechanisms of venous thrombosis and resolution.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:387-91.
- Wang R, Szabo C, Ichinose F, Ahmed A, Whiteman M, Papapetropoulos A. **The role of H₂S bioavailability in endothelial dysfunction.** *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36:568-78.
- Wang Y, Zhao X, Jin H, Wei H, Li W, Bu D, Tang X, Ren Y, Tang C, Du J. **Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:173-9.
- Wang ZT, Lau CW, Chan FL, Yao X, Chen ZY, He ZD, Huang Y. **Vasorelaxant effects of cardamonin and alpinetin from *Alpinia henryi* K. Schum.** *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37:596-606.
- Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dieken FP. **Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels.** *Biochem Pharmacol.* 1989;38:973-81.
- Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. **Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series).** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2079-93.
- Whinna HC. **Overview of murine thrombosis models.** *Thromb Res.* 2008;122 Suppl 1:S64-9.
- White RH. **The epidemiology of venous thromboembolism.** *Circulation.* 2003;107:14-8.
- Whiteman M, Moore PK. **Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability?** *J Cell Mol Med.* 2009;13:488-507.
- Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkinson DB, Moore PK. **The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages.** *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:1147-54.
- Woodall GM, Smith RL, Granville GC. **Proceedings of the Hydrogen Sulfide Health Research and Risk Assessment Symposium October 31-November 2, 2000.** *Inhal Toxicol.* 2005;17:593-639.
- Wu D, Hu Q, Zhu Y. **Therapeutic application of hydrogen sulfide donors: the potential and challenges.** *Front Med.* 2016;10:18-27.
- Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. **P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow.** *J Clin Invest.* 2002;109:939-50.
- Xie L, Gu Y, Wen M, Zhao S, Wang W, Ma Y, Meng G, Han Y, Wang Y, Liu G, Moore PK, Wang X, Wang H, Zhang Z, Yu Y, Ferro A, Huang Z, Ji Y. **Hydrogen Sulfide Induces Keap1 S-sulfhydration and Suppresses Diabetes-Accelerated Atherosclerosis via Nrf2 Activation.** *Diabetes.* 2016;65:3171-84.
- Yang G, Li H, Tang G, Wu L, Zhao K, Cao Q, Xu C, Wang R. **Increased neointimal formation in cystathionine gamma-lyase deficient mice: role of hydrogen sulfide in**

$\alpha 5\beta 1$ -integrin and matrix metalloproteinase-2 expression in smooth muscle cells. J Mol Cell Cardiol. 2012;52:677-88.

Yang G, Sun X, Wang R. **Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3.** FASEB J. 2004;18:1782-4.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. **H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase.** Science. 2008; 322:587-90.

Yin WL, He JQ, Hu B, Jiang ZS, Tang XQ. **Hydrogen sulfide inhibits MPP(+)-induced apoptosis in PC12 cells.** Life Sci. 2009;85:269-75.

Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, Abbate R, Cinotti S, Gensini GF, Masotti G, Geppetti P. **Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation.** Eur J Pharmacol. 2007;559:65-8.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. **Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation.** FASEB J. 2006;20:2118-20.

Zarate CA Jr, Niciu MJ. **Ketamine for depression: evidence, challenges and promise.** World Psychiatry. 2015;14:348-50.

Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. **A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression.** Arch Gen Psychiatry. 2006;63:856-64.

Zhang M, Shan H, Wang T, Liu W, Wang Y, Wang L, Zhang L, Chang P, Dong W, Chen X, Tao L. **Dynamic change of hydrogen sulfide after traumatic brain injury and its effect in mice.** Neurochem Res. 2013;38:714-25.

Zhang M, Shan H, Chang P, Ma L, Chu Y, Shen X, Wu Q, Wang Z, Luo C, Wang T, Chen X, Tao L. **Upregulation of 3-MST Relates to Neuronal Autophagy After Traumatic Brain Injury in Mice.** Cell Mol Neurobiol. 2017;37:291-302.

Zhao H, Chan SJ, Ng YK, Wong PT. **Brain 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST): cellular localization and downregulation after acute stroke.** PLoS ONE 2013;8:e67322.

Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J, Moore PK. **Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats.** J Appl Physiol (1985). 2007;102:261-8.

11 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

11.1 Abbildungen

- Abb. 1: Schematische Darstellung der H₂S Biosynthese
- Abb. 2: Effekte von H₂S auf das ZNS
- Abb. 3: Komponenten der Virchow'schen Trias
- Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopie aktivierter HUVECs und Thrombozyten
- Abb. 5: Chemische Synthese von GYY4137
- Abb. 6: Versuchsaufbau Durchflusszytometrie I
- Abb. 7: Durchflusszytometrie E-Selektin
- Abb. 8: Versuchsaufbau Durchflusszytometrie II
- Abb. 9: Migrationsassay
- Abb. 10: Präparation der Arteria carotis
- Abb. 11: Querschnitt durch die A. carotis nach FeCl₃ und Vehikel Behandlung
- Abb. 12: Statistische Auswertung des WST Assays
- Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der E-Selektin Expression humaner Endothelzellen
- Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse der ICAM-1 und VCAM-1 Expression humaner Endothelzellen
- Abb. 15: Statistische Auswertung der vWF Sekretion
- Abb. 16: Quantitative Densitometrie des Biotin Switch Assays von endothelialen Proteinen
- Abb. 17: Migration von HUVECs im ibidi® Migrationsassay
- Abb. 18: Statistische Auswertung des Migrationsassays nach 12 Stunden
- Abb. 19: Statistische Auswertung der Neointimabildung
- Abb. 20: Statistische Auswertung der Immunhistochemie

11.2 Tabellen

Tab. 1: Überblick über die *in vivo* Versuchsgruppen

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre.

In erster Linie danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Eberhard Grambow für die konsequente Unterstützung und außerordentliche Hilfe bei der Erarbeitung der Thematik und Fertigstellung der Dissertation. Weiterhin bedanke ich mich für die stetige Motivation sowie seine Geduld.

Ein besonderer Dank geht außerdem an Frau Professor Brigitte Vollmar, der Direktorin des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an Ihrem Institut durchzuführen. Außerdem möchte ich mich für die wissenschaftliche und stets hilfsbereite Betreuung bedanken.

Großer Dank gilt auch Frau Berit Blendow, Dorothea Frenz, Maren Nerowski und Eva Lorbeer für die wertvolle technische Assistenz im Laboralltag sowie die fortwährende Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Allen Mitarbeitern des Institutes der Experimentellen Chirurgie, auch den hier nicht namentlich genannten, bin ich für stetige Anregungen, die freundliche Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima im und außerhalb des Labors sehr dankbar.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinem Partner Malte Kämmerling, der mir Mut zugesprochen hat die Arbeit für die Promotion aufzunehmen. Außerdem bin ich für den wertvollen Zuspruch, die fortwährende Motivation und Unterstützung sowie die Abwechslung im Alltag und die mir täglich zugewendete Liebe sehr dankbar.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und mich während der gesamten Zeit des Studiums und der Promotion tatkräftig mit Hilfestellungen, Motivation, aufbauenden Worten sowie mit Zuneigung unterstützten.

13 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsamt vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Gina Klee

14 Thesen zur Dissertation

1. Obstruktive und thrombotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen trotz jahrelanger klinischer sowie experimenteller Forschung zur Prophylaxe und Therapie die häufigsten Ursachen für Tod und Invalidität in der entwickelten Welt dar.
2. Die Vorgänge während der Thrombogenese sind komplex und werden als Hämostase bezeichnet. Während der primären Hämostase wird ein initial instabiler Gefäßthrombus geformt, bei dessen Bildung die Endothel-Thrombozyten-Interaktion eine entscheidende Rolle spielt.
3. Hydrogensulfid (H_2S) ist ein endogener gasförmiger Transmitter. Aufgrund seiner bereits vielseitig beschriebenen protektiven Wirkung auf verschiedene Organsysteme und die Thrombogenese ist es wahrscheinlich, dass H_2S sein anti-thrombogenes Potential neben der Beeinflussung von Thrombozyten ebenso über die Modulation endothelialer Aktivität ausübt.
4. In der vorliegenden Studie wurden die aktuell nicht hinreichend beschriebenen Effekte von H_2S auf die Aktivität humaner Endothelzellen *in vitro* und die Bildung von arteriellen Thrombosen *in vivo* untersucht.
5. Als H_2S Donor wurde GYY4137 (GYG) verwendet, welches in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde. Es handelt sich hierbei um eine Substanz, die H_2S kontinuierlich über mehrere Stunden und in physiologischen Konzentrationen freisetzt und somit die physiologische, endogene Bildung widerspiegelt. DMSO diene als Kontrolle.

6. *In vitro* wurde die dosisabhängige Wirkung von GYY auf die Expression pro-thrombogener und pro-atherogener endothelialer Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, die vWF Sekretion, die Protein S-Sulphydrierung sowie das Migrationsverhalten humaner Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie, ELISA, Biotin Switch Assay und Migrationsassay analysiert.
7. *In vivo* erfolgte die Analyse der Neointimabildung im FeCl₃-Thrombosemodell und die Auszählung der α -SMA und PCNA positiven Zellen innerhalb der arteriellen Thrombusformation. Hierzu wurden die Tiere mit GYY oder DMSO behandelt.
8. Die Expression der untersuchten endothelialen Adhäsionsmoleküle auf aktivierten humanen Endothelzellen wurde durch die Behandlung mit GYY dosisabhängig reduziert. In Gegenwart von GYY konnte außerdem die vWF Sekretion und das Migrationsverhalten der Endothelzellen eingeschränkt sowie die S-Sulphydrierung endothelialer Proteine signifikant gesteigert werden.
9. Die Behandlung mit GYY führte im Vergleich zu DMSO zu einer signifikanten Reduktion der Neointimabildung und der Anzahl der α -SMA und PCNA positiven Zellen im Mausmodell.
10. In der vorliegenden Studie wurde die anti-thrombogene Wirkung von H₂S auf die Modulation der Aktivität humaner Endothelzellen und die arterielle Thrombogenese gezeigt. Somit sind bei thrombotischen Geschehnissen vor allem langsam-liberierende H₂S Donatoren, wie GYY, als potentielle Therapeutika anzusehen.